

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ines Bosnić**

**Transplantacija matičnih stanica u  
liječenju infarkta miokarda**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ines Bosnić**

**Transplantacija matičnih stanica u  
liječenju infarkta miokarda**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2015.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Filipa Sedlića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

Mentor rada: doc. dr. sc. Filip Sedlić, dr. med

### **Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:**

ACS- akutni koronarni sindrom (*engl.* acute coronary syndrome)

ADP- adenzin difosfat

AMI- akutni infarkt miokarda (*engl.* acute myocardial infarction)

AMP- adenzin monofosfat

ATP- adenzin trifosfat

bFGF- osnovni fibroblastni čimbenik rasta (*engl.* basic fibroblast growth factor)

BMP4- koštani morfogenetski protein 4 (*engl.* bone marrow protein 4)

BMSC- matične stanice koštane srži (*engl.* bone marrow stem cells)

CABG- prenosnica koronarne arterije (*engl.* coronary artery bypass graft)

CDC- stanice izvedene iz kardiosfera (*engl.* cardiosphere derived cells)

CHF- kronično zatajenje srca (*engl.* chronic heart failure)

cMRI- magnetna rezonancija srca (*engl.* cardiac magnetic resonance imaging)

CSC- srčane matične stanice (*engl.* cardiac stem cells)

CX- lijeva cirkumfleksna koronarna arterija

CXCR4- kemokinski receptor 4

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina

EF- e젝cijska frakcija

ESC- embrionalne matične stanice (*engl.* embryonic stem cells)

FGF2- fibroblastni čimbenik rasta 2 (*engl.* fibroblast growth factor 2)

hCSC- ljudske srčane matične stanice (*engl.* human cardiac stem cells)

hESC- ljudske embrionalne matične stanice (*engl.* human embryonic stem cells)

HIF- čimbenik induciran hipoksijom (*engl.* hypoxia-inducible factor)

HSC- hematopoetske matične stanice koštane srži (*engl.* hematopoietic stem cells)

HSP- stanične stresne bjelančevine (*engl.* heat shock proteins)

IGF-1- čimbenik rasta sličan inzulinu (*engl.* insulin-like growth factor 1)

IM- infarkt miokarda

iNOS- inducibilna sintetaza dušikova oksida (*engl.* inducible nitric oxide synthase)

iPSC- inducirane pluripotentne matične stanice (*engl.* induced pluripotent stem cells)

LAD- lijeva prednja descendentna koronarna arterija (*engl.* left anterior descending artery)

LV- lijevi ventrikul

LVEDD- krajnji dijastolički polumjer lijevoga ventrikula (*engl.* left ventricular end diastolic diameter)

LVEDV- krajnji dijastolički volumen lijevoga ventrikula (*engl.* left ventricular end diastolic volume)

LVEF- ejekcijska frakcija lijevog ventrikula (*engl.* left ventricular ejection fraction)

mBMC- mononuklearne stanice iz koštane srži (*engl.* mononuclear bone marrow cells)

MCP-1- monocitni kemotaktički protein (*engl.* monocyte chemoattractant protein)

mES-CM- kardiomiociti derivirani iz embrionalnih matičnih stanica miša (*engl.* murine embryonic cells derived cardiomyocytes)

MLHFQ skor - Minesota upitnik o kvaliteti života sa zatajenjem srca (*engl.* Minnesota Living With Heart Failure Questionnaire)

MMP- matriksna metaloproteinaza (*engl.* matrix metalloproteinase)

mPTP- mitohondrijska permeabilizacijska pora (*engl.* mitochondrial permeability transition pore)

MSC- mezenhimalne matične stanice (*engl.* mesenchymal stem cells)

NADH- nikotinamid adenin dinukleotid

NCX-  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  transporter

NF- $\kappa$ B- nuklearni čimbenik  $\kappa$ B (*engl.* nuclear factor  $\kappa$ B)

NHE-  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pumpa

NO- dušični monoksid (*engl.* nitric oxide)

NSTEMI- infarkt bez elevacije ST segmenta (*engl.* non-ST-segment elevation myocardial infarction)

NYHA- Kardiološko udruženje u New Yorku (*engl.* New York Heart Association)

PCI- perkutana koronarna intervencija (*engl.* percutaneous coronary intervention)

PIPAAm- N-isopropilakrilamid

PKC- protein kinaza C

PlGF- čimbenik rasta posteljice (*engl.* placental growth factor)

RCA- desna koronarna arterija (*engl.* right coronary artery)

ROS- slobodni radikali kisika (*engl.* reactive oxygen species)

sarcK<sub>ATP</sub>- ATP-osjetljiv sarkolemalni  $\text{K}^+$  kanal

SDF-1- čimbenik 1 deriviran iz stromalne stanice (*engl.* stromal cell derived factor 1)

SERCA- sarkolemalna  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-aza

SPECT- jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija (*engl.* single-photon emission computed tomography)

STEMI- infarkt s elevacijom ST segmenta (*engl.* ST-segment elevation myocardial infarction)

TGF- $\beta$ - transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (*engl.* transforming growth factor  $\beta$ )

VEGF- žilnoendotelni čimbenik rasta (*engl.* vascular endothelial growth factor)

## Sadržaj:

1. Sažetak .....	I
2. Summary .....	II
3. Uvod.....	1
3.1. Infarkt miokarda .....	1
3.1.1. Definicija .....	1
3.1.2. Epidemiologija .....	1
3.1.3. Etiologija .....	1
3.1.4. Patogeneza.....	1
3.1.5. Patologija.....	2
3.1.6. Dijagnostika .....	2
3.1.7. Liječenje .....	3
3.1.8. Prognoza.....	4
3.2. Kronična ishemijska srčana bolest .....	5
3.3. Nove perspektive u liječenju AMI-ja i CHF-a .....	9
4. Reakcija stanice na ishemiju .....	10
4.1. Promjene genskog izražaja u hipoksiji .....	10
4.2. Popravljiva hipoksična oštećenja stanice .....	10
4.3. Nepopravljiva hipoksična oštećenja stanice .....	10
4.4. Metaboličke promjene u ishemičnom miokardu .....	11
4.5. Omamljenost i hibernacija miokarda.....	13
4.6. Reperfuzijsko oštećenje tkiva .....	13
4.7. Ishemijsko prekondicioniranje .....	15
5. Matične stanice .....	16
5.1. Definicija .....	16

5.2.	Uloga matičnih stanica .....	16
5.3.	Vrste matičnih stanica .....	16
5.4.	Progenitorne stanice .....	18
5.5.	Povijesni razvoj .....	18
5.6.	Sličnosti i razlike embrionalnih i adultnih matičnih stanica.....	19
5.7.	Upotreba matičnih stanica .....	20
5.8.	Matične stanice prikladne za terapiju .....	21
6.	Srčane matične stanice (CSC).....	22
6.1.	Otkriće srčanih matičnih stanica.....	22
6.2.	Uloga srčanih matičnih stanica.....	22
6.3.	Vrste srčanih matičnih stanica .....	22
7.	Transplantacija matičnih stanica u terapiji infarkta .....	25
7.1.	Matične stanice koštane srži (BMSC) .....	25
7.1.1.	Mezenhimalne matične stanice (MSC) .....	25
7.1.2.	Hematopoetske matične stanice (HSC).....	27
7.2.	Embrionalne matične stanice (ESC).....	30
7.3.	Inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC) .....	32
7.4.	Srčane matične stanice (CSC) .....	32
7.5.	Prednosti i nedostaci pojedinih vrsta matičnih stanica.....	34
7.6.	Metode primjene matičnih stanica.....	34
7.7.	Transplantacija diferenciranih i nediferenciranih stanica.....	36
8.	Diskusija .....	37
8.1.	Trenutna uloga matičnih stanica u terapiji IM-a i CHF-a .....	37
8.2.	Mehanizmi djelovanja matičnih i progenitornih stanica .....	38
8.3.	Uspjesi istraživanja na životinjama i klinička istraživanja.....	38
8.4.	Metode primjene.....	40
8.5.	Rizici.....	40



8.6.	Budući izazovi .....	40
9.	Zaključak.....	42
10.	Zahvale .....	43
11.	Literatura .....	44
12.	Životopis.....	50

## **1. Sažetak**

### **Transplantacija matičnih stanica u liječenju infarkta miokarda**

Bosnić I.

Ljudsko srce ima ograničeni regenerativni kapacitet i zbog toga njegov funkcionalni oporavak predstavlja velik izazov. Unatoč dostignućima u farmakološkom i kiruškom liječenju ishemijskih bolesti miokarda, one su i dalje među glavnim uzrocima morbiditeta i mortaliteta u razvijenim zemljama. Nadomjestak oštećenih kardiomiocita nova je paradigma u liječenju, međutim ograničava je nedostatak ljudskih kardiomiocita koje bi se koristili u tu svrhu. Nedavna otkrića embrionalnih matičnih stanica, adultnih matičnih stanica, induciranih pluripotentnih matičnih stanica i unipotentnih satelitskih stanica, te matičnih stanica u samome srcu predstavljaju potencijalno rješenje problema.

U ovome diplomskom radu baviti ću se vrstama stanica koje bi se mogle upotrijebiti u terapiji infarciranog miokarda, te prednostima i nedostacima svake vrste. Spomenuti ću načine njihove primjene- intrakoronarno, intrakardijalno, stvaranje slojeva stanica ili tkiva za transplantaciju. Biti će opisane neke od studija na životinjama i do sada provedena, značajnija klinička istraživanja. Raspraviti ću potencijalne mehanizme kojima matične stanice mogu dovesti do poboljšanja srčane funkcije – diferencijacijom u nove kardiomiocyte, imunomodulatornim učincima ili parakrinom signalizacijom. Neke od potencijalnih komplikacija će također biti spomenute, poput imunosnog odbacivanja, poticanja autoimunog odgovora i formacije tumora.

Konačno, opisati ću predstojeće izazove, koji moraju biti prevladani prije šire kliničke upotrebe ove terapije.

**Ključne riječi:** ishemijska bolest srca, matične stanice, regeneracija

## **2. Summary**

### **Cardiac stem cell transplantation in therapy of infarcted myocardium**

Bosnić I.

Adult human heart has limited regenerative capacity, and therefore, functional restoration of the damaged heart presents a great challenge. Despite the progress achieved in the pharmacological and surgical treatment of ischemic myocardial diseases, they are still considered one of the major causes of morbidity and mortality in developed countries. Repopulation of the damaged heart with cardiomyocytes represents a novel therapeutic paradigm, but is hampered by the lack of human cardiomyocytes that would be used for this purpose. The recent derivation of human embryonic stem cell lines, adult stem cells, induced pluripotent stem cells, unipotent satellite cells, and cardiac resident stem cells may provide a solution for this problem.

This thesis will focus on the types of stem cells that can be used for the treatment of infarcted myocardium and their potential sources. The means of stem cells application will be mentioned – intravenous, intracoronary, cell layers and engineered tissues. Some of the experimental studies will be described, as well as some clinical trials. Potential mechanisms of stem cells contribution to heart regeneration – by differentiation to new cardiomyocytes, immunomodulatory effects, or paracrine signalization – will be discussed. Some of the potential clinical complications of this procedure will also be discussed, such as graft rejection, induction of autoimmune response and tumor formation.

Finally, the hurdles and challenges toward fully harnessing the potential clinical applications of these unique cells will be described.

**Key words:** ischemic cardiac disease, stem cells, regeneration

### **3. Uvod**

#### **3.1. Infarkt miokarda**

##### **3.1.1. Definicija**

Infarkt miokarda (IM) ireverzibilna je nekroza srčanog mišića zbog dugotrajne ishemije. Incidencija infarkta miokarda je 5/100.000 godišnje u razvijenim zemljama (Krušlin B i Nola M, 2011).

##### **3.1.2. Epidemiologija**

IM je bolest starije dobi, a više je od polovine bolesnika (oko 55%) starije od 65 godina. U dobi do 60 godina muškarci oboljevaju 4-5 puta češće nego žene, no u uznapredovaloj dobi razlika je manje uočljiva. IM se češće pojavljuje u osoba koje imaju neke od rizičnih čimbenika kao što su obiteljska sklonost srčanim bolestima i aterosklerozi, hipertenzija, dijabetes, pretilost i pušenje cigareta (Krušlin B i Nola M, 2011). Kardiovaskularne bolesti uzrok su više od polovine smrti u Europi, a vjeruje se da ih je 80% moguće spriječiti (<http://www.euro.who.int/>).

##### **3.1.3. Etiologija**

IM je u više od 95% oboljelih uzrokovan aterosklerozom koronarnih arterija. Najčešće se radi o rupturi nestabilnog aterosklerotskog plaka sa stvaranjem tromba i okluzijom krvne žile. U manjine bolesnika je uzrokovan sistemnom hipotenzijom, emboličnim začepljenjem koronarnih krvnih žila, spazmom krvnih žila uzrokovanim kokainom i sistemskim vaskulitisom koji zahvati i koronarne arterije.

##### **3.1.4. Patogeneza**

S obzirom na patogenezu postoje dvije vrste infarkta: transmuralni i subendokardijalni infarkt. *Transmuralni infarkti* ograničeni su na anatomsko područje koje opskrbljuje jedna koronarna arterija. Takve se nekroze protežu od epikarda gotovo do endokarda, odnosno zahvaćaju skoro cijelu debljinu stijenke. Najčešće dolazi do začepljenja jedne od triju glavnih koronarnih arterija: lijeve prednje silazne arterije (LAD), desne koronarne arterije (RCA) i lijeve cirkumfleksne arterije (CX). LAD je zahvaćena u 40-50% slučajeva i rezultira infarktom prednje stijenke lijeve klijetke prema apeksu, prednjeg dijela ventrikularne pregrade i čitavog opsega apeksa. Začepljenje RCA uzrokuje infarkt stražnjeg dijela stijenke lijeve klijetke, stražnjeg dijela ventrikularne pregrade i desne klijetke, a javlja se u 30-40%

slučajeva. Začepljenje CX javlja se u 15-20% slučajeva i zahvaća lateralni dio stijenke lijeve klijetke, osim apeksa. *Subendokardijalni infarkt* nastaje tijekom hipotenzivnih epizoda, bez oštećenja koronarnih arterija. Oštećenje je ograničeno na subendokardijalni dio miokarda i obično obuhvaća čitav opseg lijeve klijetke (Krušlin B i Nola M, 2011).

### 3.1.5. Patologija

Mikroskopske promjene u području infarkta slične promjenama koje se vide u toku cijeljenja rane. Nakon prvotnog oštećenja nekrotično tkivo infiltriraju neutrofili, koje ubrzo zamjene makrofagi. Makrofagi izlučuju citokine i čimbenike rasta koji stimuliraju urastanje angioblasta i fibroblasta i stvaranje granulacijskog tkiva. S vremenom se granulacijsko tkivo pretvori u vezivni ožiljak. U tablici 1. prikazan je slijed mikroskopski vidljivih promjena u infarktu miokarda.

Tablica 1. Slijed promjena u infarktu miokarda (Krušlin B i Nola M, 2011)

Vrijeme	Vrsta promjena	Mikroskopske promjene
<b>0-24 sata</b>	Ireverzibilno oštećenje miocita	Valovita vlakna, hiperkontrakcija
<b>1-3 dana</b>	Nekroza i akutna upala	Nekroza miocita, brojni neutrofili
<b>4-6 dana</b>	Akutna i kronična upala	Piknotični neutrofili, makrofagi, ostatci nekrotičnih miocita
<b>1-2 tjedna</b>	Kronična upala i granulacijsko tkivo	Makrofagi, angioblasti, fibroblasti
<b>2-5 tjedana</b>	Granulacijsko tkivo	Angioblasti, fibroblasti, makrofagi, kolagen
<b>6 tjedana</b>	Ožiljak	Fibroblasti i obilni kolagen

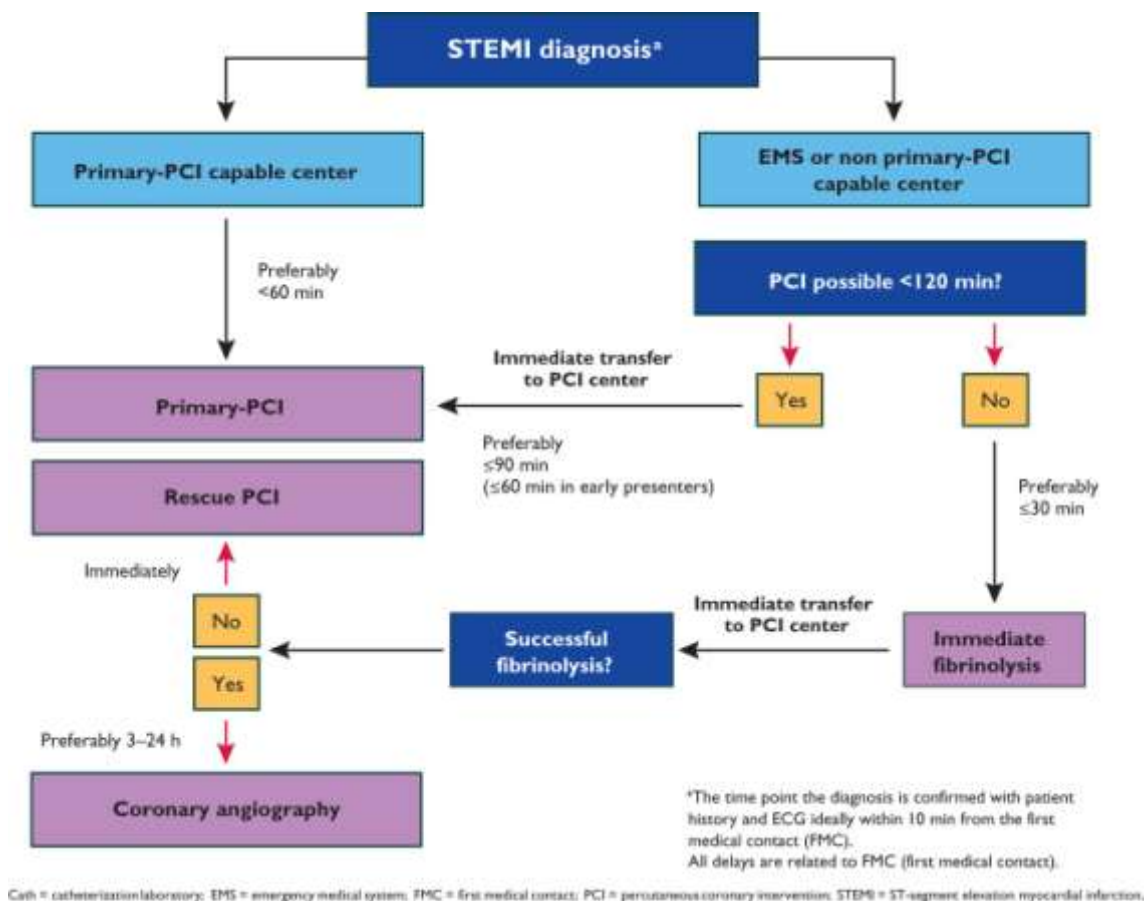
### 3.1.6. Dijagnostika

Dijagnoza IM-a se postavlja na osnovi kliničkog pregleda, EKG-a te laboratorijskih nalaza. Tipični simptomi infarkta su produžena prekordijalna bol, dužeg trajanja i jačeg intenziteta od anginozne boli, a bol se može širiti u lijevu stranu vrata ili lijevu ruku. Mogu se javiti mučnina, nagon na povraćanje, znojenje, gušenje i dispneja. Od kliničkih znakova može se javiti tahikardija, sniženje tlaka u odnosu na normalnu bolesnikovu visinu tlaka, nepravilan puls i krepitacije nad plućima. U 20% IM je asimptomatičan. EKG često pokazuje tipične ishemijske promjene (obrnute T valove), a ponekad i elevaciju ili denivelaciju ST spojnice. Nakon stvaranja ožiljka nad zahvaćenim područjem zaostaju Q zupci. Laboratorijski nalazi pokazuju izrazitu dinamiku porasta i pada vrijednosti mioglobina, troponina i kreatinin kinaze u toku prvih 24 sata. Unutar prva dva sata dolazi do povišenja mioglobina, nespecifičnog ranog znaka IM-a. Tri do četiri sata od početka infarkta dolazi do povišenja troponina I i T.

Kod velike većine oni su pozitivni unutar 6 sati od početka infarkta i vrlo su osjetljiv znak IM-a. Četiri do šest sati od početka IM-a iz oštećenih miocita oslobađa se MB frakcija enzima kreatin-kinaze (CK).

### 3.1.7. Liječenje

Morbiditet i mortalitet značajno su smanjeni ukoliko se rano prepoznaju simptomi i znakovi, brzo se poduzme hitno zbrinjavanje bolesnika, te se pravodobno poduzme definitivno liječenje. U hitnom zbrinjavanju bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, koji uz IM uključuje i nestabilnu anginu pectoris, upotrebljavaju se morfij, kisik, nitroglicerina, aspirin i klopidoogrel (Longmore M, 2010). Primarni cilj je utvrđivanje postojanja ST elevacije, odnosno prepoznavanje infarkta sa ST elevacijom (*engl.* ST-segment elevation myocardial infarction STEMI) i infarkta bez ST elevacije (*engl.* non-ST-segment elevation myocardial infarction, NSTEMI). STEMI infarkt je infarkt s novonastalom elevacijom ST segmenta na razini J točke  $\geq 0.2$  mV kod muškaraca ili  $\geq 0.15$  mV kod žena u odvodima V2 i V3; i/ili elevacija  $\geq 0.1$  mV u bilo koja dva susjedna EKG odvoda, dok NSTEMI označuje sve srčane infarkte kojima je zajednički nazivnik izostanak ST elevacije u EKG-u (<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehs215>). Ovisno o tome o kojem se od ta dva glavna tipa IM-a radi, ovisi razina dokaza o poduzimanju određenih terapijskih procedura. Potrebna je što ranija reperfuzija miokarda, kako bi se spasilo što više ugroženog miokarda. To se postiže bilo medikamentozno ili invazivnim postupcima. Kemijska sredstva su fibrinolitici (trombolitici), streptokinaza i alteplaza. To su enzimi koji izravnom ili neizravnom aktivacijom plazminogena stvaraju plazmin, koji razgrađuje fibrin ili cijepa tromb (Buljević B i Reiner Ž, 2010). Fibrinolitici se primjenjuju ukoliko ne postoji mogućnost kateterizacije srca i stavljanja intrakoronarnog stenta. Učinkovita je terapija ukoliko se primjeni unutar 3-6 h od početka bolova. Kod STEMI i pacijenata s nestabilnim NSTEMI provodi se kateterizacija srca s postavljanjem stenta u okludiranu krvnu žilu- perkutana koronarna intervencija (*engl.* percutaneous coronary intervention, PCI) (Vrhovac B i sur., 2003.). PCI je terapija zlatnog standarda u liječenju IM. Indikacije za reperfuziju su: bol u prsima u trajanju  $\leq 12$  sati koja ne popušta na nitrate, perzistentna elevacija ST spojnice u barem dva odvoda jedne regije, slika posteriornog infarkta, novonastali blok lijeve grane, prezentacija 12-24 sata od nastupa akutnog koronarnog sindroma (ACS) u slučaju kontinuiranih bolova i znakova infarkta u razvoju. Smjernice za postupanje s pacijentom sa STEMI infarktom prikazane su na slici 1. Alternativni način revaskularizacije je kardiokirurška operacija postavljanja prenosnice srčane arterije (*engl.* coronary artery bypass graft, CABG).



Slika 1. Strategija reperfuzije, smjernice European Society of Cardiology iz 2012. godine (<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehs215>)

Daljnje mjere osiguravaju smanjenje boli, osiguranje balansa opskrbe i potrošnje energije i prevencija ili liječenje komplikacija. Dobro razvijena kolateralna cirkulacija bitan je faktor smanjenja ozljede miokarda. U uvjetima mirovanja ona je često dovoljna da se održe uvjeti bez ishemije, međutim u uvjetima pojačanih napora ili stresa zbog nedostatka autoregulacije kolateralna cirkulacija postaje insuficijentna. Stoga je potrebo strogo mirovanje (<http://emedicine.medscape.com/>).

### 3.1.8. Prognoza

Smrtni ishod zbog kardijalnog aresta može se očekivati kod 20% bolesnika koji dožive infarkt. Među preživjelim 10-20% ima nekomplikiran tijek oporavka. U ostalih 80-90% nastaju komplikacije. Od komplikacija valja spomenuti aritmije, zatajivanje srca, proširenje infarkta, stvaranje muralnih tromba i tromboembolija, fibrinozni perikarditis, rupturu miokarda i ventrikularnu aneurizmu. Aritmije se javljaju u oko 80% bolesnika i najčešći su uzrok smrti u neposrednom postinfarktnom razdoblju. Proširenje infarkta javlja se u 10%

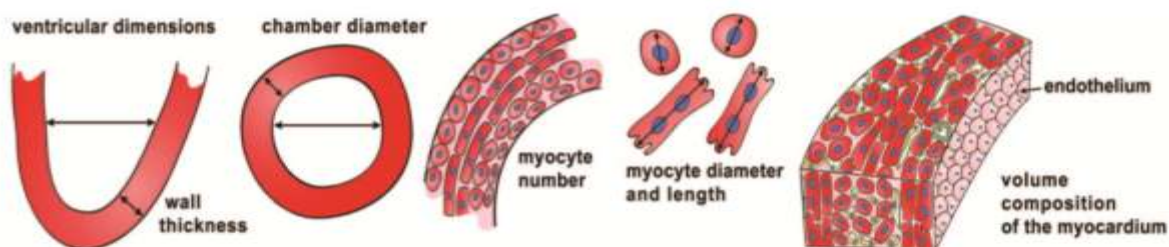
pacijenata tijekom prvog tjedna i širi se na rubna područja s marginalnom opskrbom kisika uslijed pojačanog naprezanja. Uslijed oštećenja endokarda ili vrtložnog protoka krvi u proširenim pretklijetkama i klijetkama u 30% bolesnika dolazi do stvaranja muralnih tromba koji mogu biti izvor embola te uzrokovati infarkte mozga, crijeva, bubrega, slezene i dr. Fibrinozni perikarditis javlja se tijekom prvog tjedna u oko 30% pacijenata s transmuralnim IM. Ako se javi poslije 2-6 tjedana od infarkta radi se o autoimunnoj reakciji na proteine iz nekrotičnih srčanih stanica poznatoj kao Dresslerov sindrom. Ruptura miokarda javlja se u 5% bolesnika uslijed razmekšanja srčanog mišića radi nekroze i djelovanja litičkih enzima upalnih stanica. Ovisno o mjestu puknuća miokarda- na slobodnoj stijenci, papilarnom mišiću ili pak interventrikularnoj pregradi može doći do potencijalno smrtonosnih komplikacija tamponade srca, insuficijencije mitralnog ušća ili pak komunikacije lijeve i desne klijetke sa zatajenjem srca. U manjeg broja bolesnika, 2-3% njih, na mjestu formiranog ožiljka nastaje ventrikularna aneurizma. Budući da se ožiljci ne mogu kontrahirati tijekom sistole, pod povišenim tlakom s vremenom se izbočuju. Takvo je područje pogodno za nastanak tromba (Krušlin B i Nola M, 2011).

### **3.2. Kronična ishemijska srčana bolest**

Kronična ishemijska srčana bolest je zatajivanje srca kao posljedica kroničnog ishemijskog oštećenja miokarda. Javlja se u starijih bolesnika, s aterosklerozom zahvaćenim krvnim žilama. Hipoksična oštećenja pokreću kaskadu događaja, s formacijom ožiljnog tkiva, tlačnim i volumnim preopterećenjem i prerastezanjem kardiomiocita (Krušlin B i Nola M, 2011). Pokušaj održanja minutnog volumena i ejekcijske frakcije retencijom tekućine na kraju vodi zatajenju srca i smrti. Kao rezultat povećanog opterećenja kardiomiociti mogu i učeterostručiti svoj volumen, a regulacijom proizvodnje i razgradnje citoplazmatskih proteina i mitohondrija mogu modulirati svoje ponašanje (Leri A i sur., 2011). Povećanje radnog opterećenja rezultira hipertrofijom miocita, međutim kada ono prijeđe kritičnu granicu, daljnja hipertrofija nije moguća te dolazi do disfunkcije ventrikula. U toj disfunkciji bitnu ulogu igra i relativno sporije remodeliranje u odnosu na brz nastup hemodinamskih opterećenja. Prilikom hipertrofije dolazi i do promjena u homeostazi kalcija i ionskih struja, što rezultira poremećajima u kontraktilnosti. Neurohumoralne promjene, pomak prema glikolitičkom metabolizmu, nedostatna krvna opskrba, remodeliranje izvanstaničnog matriksa i  $\beta$ -adrenergička aktivacija pogoršavaju zatajenje. Do nedavno se vjerovalo da je regeneracija miocita nemoguća, te da se volumen srca mijenja jedino na račun hipertrofije miocita. Međutim, otkrićem srčanih matičnih stanica ta se paradigma mijenja, te se danas smatra da

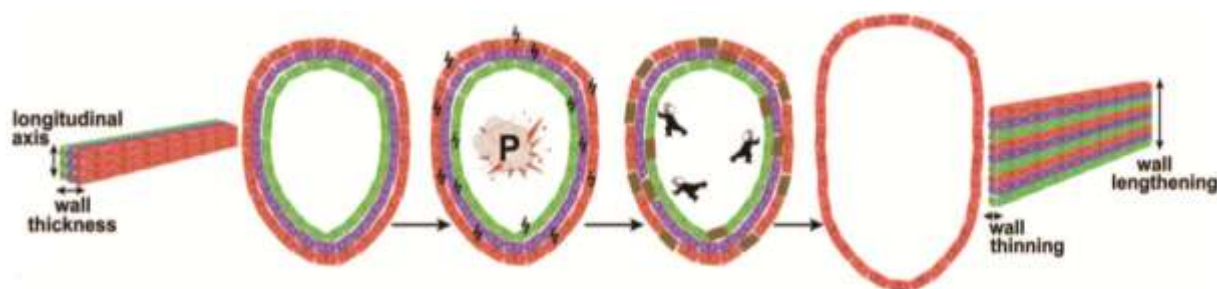


balans između funkcijskog preopterećenja i odgovora srca na to opterećenje ovisi o nastanku miocita, njihovu rastu te smrti. Rast miocita podrazumijeva njihovu hipertrofiju i proliferaciju, a smrt se javlja u obliku apoptoze i nekroze (Leri A i sur., 2011). Funkcijsko preopterećenje, s posljedičnim remodeliranjem srca često se viđa kod valvularnih grešaka (primjerice aortne stenoze ili mitralne insuficijencije) ili pak nakon IM-a. Kod *fiziološke* hipertrofije srca (primjerice kod treniranih sportaša ili u trudnoći) povećava se broj i masa kardiomiocita, a rast koronarne vaskulature još je intenzivniji od porasta kardiomiocita. Točni mehanizmi ove fiziološke hipertrofije u sportaša i u trudnoći se ne znaju. Također nije poznato da li prestankom vježbanja/trudnoće ti novostvoreni kardiomiociti odumiru ili atrofiraju. *Patološka* hipertrofija često vodi k zatajenju srca, čemu pridonosi nesrazmjer povećanja mišićne mase u odnosu na povećanje opskrbe krvlju. Kako bi se detaljnije mogli istražiti mehanizmi hipertrofije, bilo je potrebno pronaći molekularni korelat dekompenzirane srčane hipertrofije. Vjeruje se da bi ekspresija fetalnih gena  $\alpha$ -aktina i teškog lanca  $\beta$ -miozina mogla biti dobar pokazatelj dekompenzirane hipertrofije, međutim ne zna se radi li se o ekspresiji gena u novostvorenih miocita ili pak dedifrencijaciji terminalno diferenciranih miocita. Dilatacija ventrikula i zadebljanje stijenke srca dva su temeljna strukturna pokazatelja zatajenja srca (slika 2). Oni su lako anatomske mjerljivi i ukazuju na stupanj disfunkcije srca.



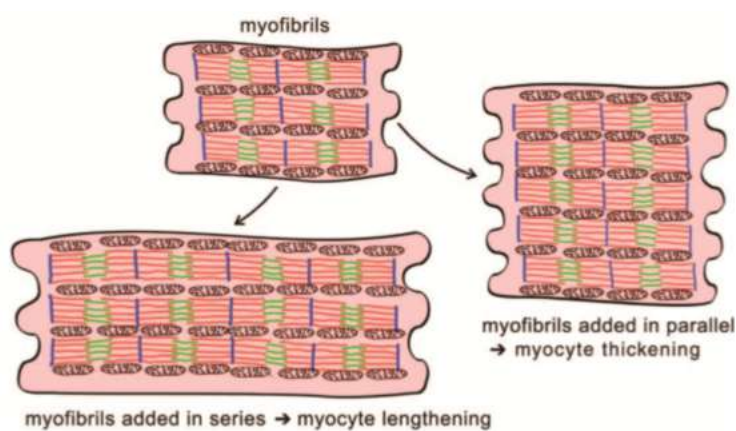
Slika 2. Strukturne odrednice zatajenja srca - debljine stijenke srca i polumjer klijetke (Leri A i sur., 2011)

Međutim i tkivna arhitektura određuje funkciju ventrikula, te je bitan parametar u utvrđivanju i procjeni bolesti srca. Prema Laplaceovom zakonu funkcija ventrikula ovisi o masi miokarda, hemodinamskom opterećenju i anatomiji srca. Napetost stijenke srca umnožak je tlaka i polumjera srca, podijeljenog s debljinom stijenke. Ovisno o tome radi li se o volumnom opterećenju (dijastoličko ili predopterećenje) ili o tlačnom opterećenju (sistoličko ili naknadno opterećenje) miociti se slažu serijski, odnosno paralelno te doprinose dilataciji odnosno zadebljanju ventrikula (slika 3).

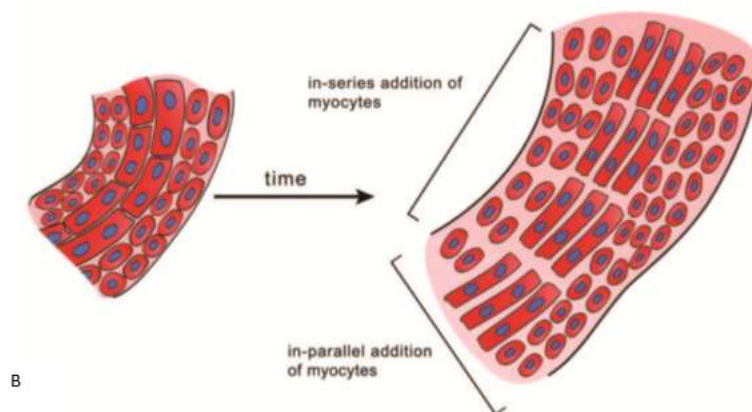


Slika 3. Iznenaadne promjene dijastoličkog tlaka u klijetci dovode do apoptoze kardiomiocita, te redistribucije kardiomiocitnih slojeva u stijenci zbog međusobnog klizanja. Gubitak pojedinih miocita i pomak među slojevima dovodi do dilatacije klijetke (Leri A i sur., 2011)

Za primjer tlačnoga opterećenja mogu se uzeti aortalna ili pulmonalna stenoza, a volumno opterećenje javlja se primjerice kod insuficijencija aortne valvule (Gamulin S i sur., 2011). Promjene oblika stanice vrlo su specifične ovisno o vrsti opterećenja kojoj stanica podliježe, međutim nije točno poznato zašto volumno opterećenje dovodi do serijskog dodavanja sarkomera, a porast tlaka do paralelnog dodavanja sarkomera (slika 4).



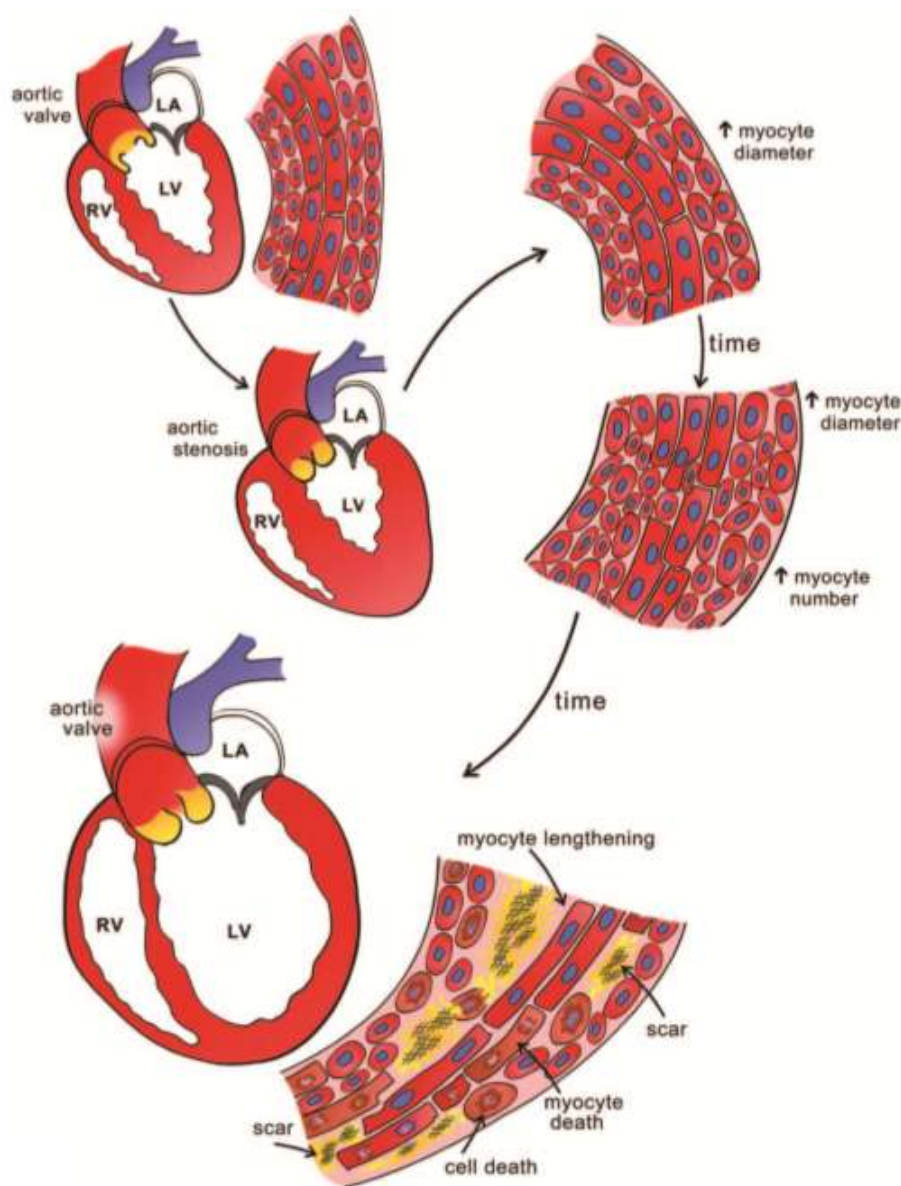
A



B

Slika 4. Način rasta sarkomere doprinosi rastu miocita u dužinu ili širinu (A), dok se novi miociti mogu se dodavati serijski ili paralelno (B) (Leri A i sur., 2011)

S vremenom, gubitak stanica, ožiljkaste promjene, neproporcionalno produženje miocita i nedovoljna regeneracija doprinose zatajenju srca (slika 5). Neki miociti su normalne veličine, međutim brojni su atrofični i sadržavaju lipofuscin, dok su drugi hipertrofični i povećanih jezgara. Krpičasta žarišta fibroze nadomještaju kardiomiocite, a mjestimično se vide i veći ožiljci na mjestu zacjeljenih infarkta miokarda. Klinički se očituje postupnim zatajenjem lijevoga i desnoga srca (Krušlin B i Nola M, 2011)



Slika 5. Anatomske i stanične promjene, oštećenje tkiva i nakupljanje kolagena uzrokuju prijelaz tlačnog preopterećenja u zatajenje srca (Leri A i sur., 2011)

### **3.3. Nove perspektive u liječenju AMI-ja i CHF-a**

Unatoč napretku u području medikamentoznog i kiruškog liječenja ishemijskih bolesti miokarda, one su i dalje glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu. Pojava brojnih novih terapijskih opcija poput resinkronizacijske terapije, kiruške kardiomioplastike i umjetnog srca pokušaji su optimizacije srčane funkcije nakon ozljede miokarda. Unatoč svim tim terapijskim opcijama značajan broj pacijenata razvije zatajenje srca s posljedičnim funkcijskim ograničenjima (Feng Y i sur., 2012). Repopulacija oštećenog srca s kardiomiocitima predstavlja novu terapijsku paradigmu liječenja ishemijskih kardiovaskularnih bolesti (Caspi O i Gepstein R, 2006). Pokusi na životinjama i klinička istraživanja sugeriraju da bi se infarcirani ili kroničnom ishemijom oštećeni miokard mogao regenerirati uz pomoć transplantacije matičnih stanica.

## 4. Reakcija stanice na ishemiju

### 4.1. Promjene genskog izražaja u hipoksiji

Hipoksija je česti uzrok oštećenja stanica. U akutnoj hipoksiji dolazi do promjena u enzimskoj aktivnosti, dok se u kroničnoj hipoksiji organizam prilagođava opsežnim promjenama genskog izražaja, s promjenama metaboličkih puteva i stanične funkcije koje omogućavaju bolje preživljenje hipoksičnih prilika. Stanični senzor zamjećuje smanjenje parcijalnog tlaka kisika te počinje sintezu čimbenika induciranog hipoksijom (*engl.* hypoxia-inducible factor, HIF). To je transkripcijski čimbenik koji se veže za specifične promotore brojnih gena i potiče njihovo očitovanje. U svim stanicama potiče sintezu glikolitičkih enzima i time anaerobnu glikolizu. U endotelnim stanicama potiče sintezu žilnoendotelnog čimbenika rasta (*engl.* vascular endothelial growth factor, VEGF) i angiogenezu, te inducibilne sintetaze dušikova oksida (*engl.* inducible nitric oxide synthase, iNOS) i vazodilataciju. U bubrezima potiče sintezu eritropoetina i posljedičnu eritropoezu, u glomus karotikusu sintezu tiroksin hidroksilaze, s posljedično povećanom sintezom dopamina i hiperventilacijom. U dugotrajnoj hipoksiji u fibroblastima se aktiviraju geni *jun* i *fos*, potiče se sinteza transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (*engl.* transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ), te potiče sinteza kolagena s posljedičnom fibrozom hipoksičnog tkiva (Kovač Z i Gamulin S, 2011).

### 4.2. Popravljiva hipoksična oštećenja stanice

U akutnoj hipoksiji, prestankom oksidativne fosforilacije nastaje manjak adenozin trifosfata (ATP). ATP se još neko vrijeme generira anaerobnom glikolizom, međutim kao produkt razgradnje glukoze nakuplja se mliječna kiselina, koja je zaustavlja i blokira taj zadnji, spasonosni mehanizam nastanka ATP-a. U stanici nastupom hipoksije prvo nastupaju popravljiva oštećenja stanice: javljaju se poremećaji transportnih procesa ( $\text{Ca}^{2+}$  crpke i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-aze), u stanici se nakupljaju kalcij, natrij i voda, a gubi se kalij, proširuju se stanične cisterne, inhibira se sinteza bjelančevina. Ukoliko dođe do uspostave oksigenacije u ovoj fazi njihova funkcija se može oporaviti, kao i druge stanične funkcije (Kovač Z i Gamulin S, 2011).

### 4.3. Nepopravljiva hipoksična oštećenja stanice

Kod duljeg trajanja hipoksije nastupa permeabilitetna tranzicija mitohondrija. Uslijed povećane propusnosti mitohondrijske membrane mitohondriji bubre, raspreže se oksidativna fosforilacija, povećava proizvodnja superoksidnog aniona i istječu kalcij i mitohondrijske bjelančevine, što nepovoljno utječe na sve stanične procese. Kalcij se veže s kalmodulinom ili

neposredno aktivira niz mehanizama koji oštećuju stanicu. Kalcij kalmodulin kompleks aktivira fosfolipazu A1 i A2 ugrađenu u stanične membrane, uzrokujući oslobađanje masnih kiselina. Oslobađa se arahidonska kiselina, razgrađuje se ciklooksigenazom i lipooksigenazom, pri čemu nastaju slobodni radikali kisika. Kalcij kalmodulin kompleks aktivira proteazu koja ksantin dehidrogenazu pretvara u ksantin oksidazu. Taj je enzim posebno obilan u endotelnim stanicama i sudjeluje u oksidaciji hipoksantina i ksantina. Prelaskom u formu ksantin oksidaze umjesto generiranja nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) ovaj enzim počinje stvarati superoksidne anione, koji dalje prelaze u vodikov peroksid i hidroksilne radikale. Kalcij kalmodulin kompleks također potiče aktivnost iNOS, a nastali dušični monoksid (*engl.* nitric oxide, NO) reagira sa slobodnim radikalima stvarajući peroksinitritni ion i OH<sup>•</sup> (Kovač Z i Gamulin S, 2011).

#### **4.4. Metaboličke promjene u ishemičnom miokardu**

Miokard aerobnim procesima podmiruje goleme energetske potrebe. Oksidacijom masnih kiselina, glukoze, laktata i aminokiselina nastaje energija koja se pohranjuje u obliku fosfata s visokim sadržajem energije. Zaliha supstrata za dobivanje energije u miocitu su triacilgliceroli i glikogen. Bogata kapilarna mreža omogućuje difuziju kisika iz krvi u miocite.

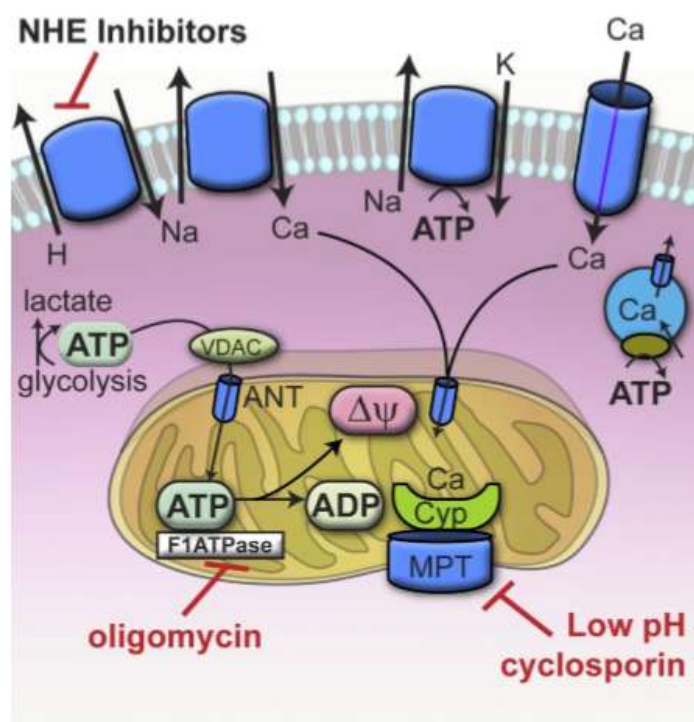
U ishemičnom miokardu prevladava iskorištenje ugljikohidrata kao energetskog izvora, suprotno fiziološkim okolnostima kada prevladava oksidacija masnih kiselina. Produbljenjem hipoksije aerobni metabolizam prelazi u anaerobni, te dolazi do nakupljanja mliječne kiseline i iona vodika. Ti metaboliti koče glikolizu i prije no što je potrošena zaliha glikogena. Ovaj je fenomen jače izražen u ishemiji nego u hipoksiji zbog smanjena „ispiranja“ otpadnih produkata metabolizma. U ishemičnom miokardu veća je potrošnja ATP-a nego proizvodnja. Stoga dolazi do zatajenja funkcija ovisnih o ATP-u – kontrakcije i relaksacije miokarda, te održavanja ionske homeostaze (Šmalcelj A i Duraković Z, 2011).

Svaka sistola započinje ulaskom Ca<sup>2+</sup> pomoću L-tipa kalcijских kanala, a povišenje Ca<sup>2+</sup> u citoplazmi potiče i otpuštanje kalcija iz sarkoplazmatskog retikuluma. Po završetku mišićne kontrakcije većina kalcija se uklanja pomoću Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transportera (NCX), koji ga izbacuje iz stanice, a manji dio uklanja sarkolemalna Ca<sup>2+</sup> ATP-aza (SERCA). Međutim, u uvjetima acidoze, višak vodikovih iona izbacuje Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pumpa (NHE), povećavajući svojim radom unutrastaničnu koncentraciju Na<sup>+</sup>. Promjene polarizacije membrane i porast koncentracije natrija aktiviraju obrnuto djelovanje NCX transportera, što dovodi do porasta Ca<sup>2+</sup> u kardiomiocitu. Nakupljeni Ca<sup>2+</sup> u stanici može uzrokovati aritmije, katkad smrtonosne, ili



produljenu kontrakciju kardiomiocita s posljedičnim oštećenjem. Dio  $\text{Ca}^{2+}$  se ubacuje i u mitohondrij, koristeći  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter, te za svoje djelovanje troši energiju potencijala mitohondrijske membrane, koji inače služi za generiranje ATP-a iz adenzin difosfata (ADP). Na taj se način još više smanjuje energetska proizvodnja stanice (Murphy E i Steenbergen C, 2008).

Slika 6 pokazuje ionske i metaboličke promjene u stanici tijekom ishemije i način na koji povećanje količine protona dovodi do porasta intracelularnog kalcija. Reverzna forma mitohondrijske  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase troši stanični ATP kako bi stvarala transmembranski gradijent  $\Delta\Psi$ . Energija toga gradijenta se troši na ulazak kalcija u stanicu. Taj kalcij može aktivirati mitohondrijske permeabilizacijske pore (*engl.* mitochondrial permeability transition pore, mPTP), ali u vrijeme ishemije one još nisu aktivne jer ih blokira niski pH. Reperfuzijom se aktivira mPTP koja vodi k daljnjem oštećenju stanice.



Slika 6. Ionske i metaboličke promjene u ishemiji (Murphy E i Steenbergen C, 2008)

Defosforilacijom adenzin monofosfata (AMP) u adenzin uslijed manjka ATP-a, gubi se mogućnost obnove staničnih energetskih zaliha, budući da adenzin difundira kroz staničnu membranu i odlazi iz stanice. Nakupljanjem metabolita u stanici s mnoštvom novonastalih molekula mliječne kiseline iz jedne molekule glikogena, te zbog zatajenja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-aze,

dolazi do povećanog osmotskog opterećenja stanice, staničnog bubrenja i smrti. Uz to brojni metaboliti mogu biti i direktno toksični po stanicu. Aktivacija unutarstaničnih proteaza nakupljenim kalcijem dovodi do razgradnje strukturnih elemenata što doprinosi nekrotičnoj smrti stanice. Na periferiji samog infarkta se susreće i apoptoza radi viših staničnih koncentracija ATP-a. Važnu ulogu u oštećenju stanice igraju i slobodni radikali kisika koji se naročito snažno proizvode u početku reperfuzije (Šmalcelj A i Duraković Z, 2011).

#### **4.5. Omamljenost i hibernacija miokarda**

U nekim slučajevima određeni segmenti miokarda mogu djelovati mrtvi, međutim nakon revaskularizacije toga područja može im se oporaviti kontraktilnost. Radi se o fenomenima omamljenosti i hibernacije. Omamljenost (*engl.* stunning) se odnosi na prolazno slabljenje ili gubitak mehaničke funkcije miokarda nakon kraćih razdoblja ishemije. Pretpostavlja se da je uzrok omamljenja gubitak adeninskih nukleotida, čija je obnova resintezom razmjerno spor proces. Hibernacija miokarda je reverzibilna miokardna disfunkcija u kroničnoj ishemiji. Nakon uspostavljanja protoka PCI-em ili CABG-om segmenti koja su mjesecima ili godinama bili bez odgovarajuće mehaničke funkcije oporavljaju kontraktilnost. Ovakva dugotrajna ili opetovana ishemija može preko izmijenjene ekspresije gena uzrokovati reverzibilne promjene u funkcionalno vrlo važnim proteinskim strukturama poput ionskih kanala (Šmalcelj A i Duraković Z, 2011).

#### **4.6. Reperfuzijsko oštećenje tkiva**

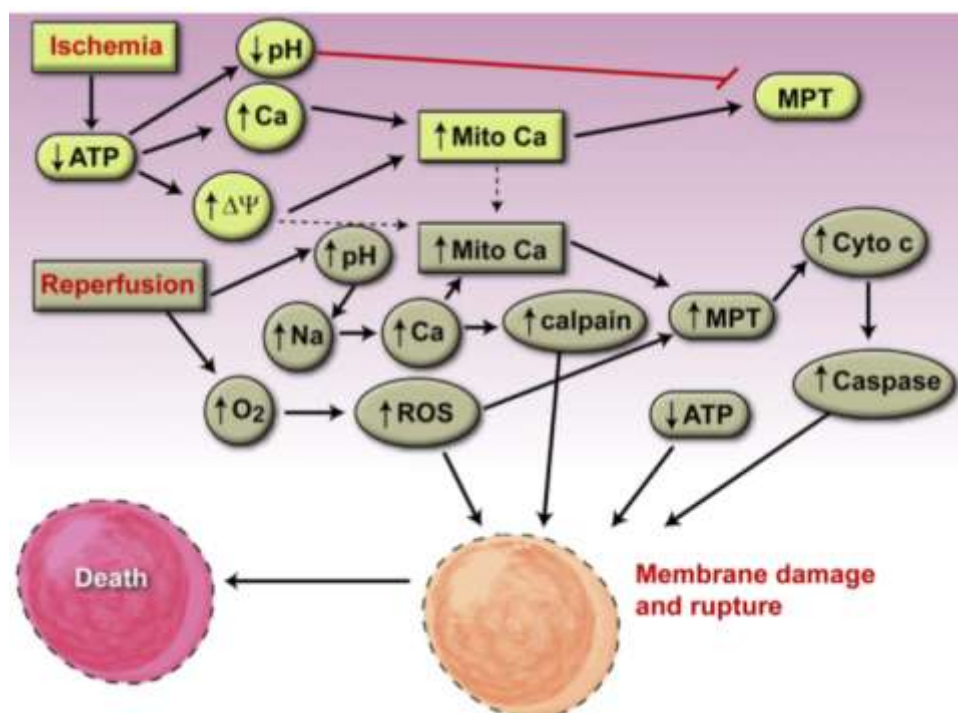
Metaboličke promjene u stanicama u vrijeme ishemije stvaraju uvijete za nastanak slobodnih radikala. Mala količina kisikovih radikala (*engl.* reactive oxygen species, ROS) koja nastaje tijekom ishemije oštećuje komponente I i III lanca prijenosa elektrona u mitohondrijskoj membrani. Zbog tih oštećenja transport elektrona postaje neefikasan i dalje se generiraju novi ROS. Uz to se smanjuje aktivnost enzima koji brane stanicu od njih (superoksid dismutaze, katalaze i glutathion reduktaze). Dolazi do oksidativnog stresa, stanja u kojem je proizvodnja slobodnih radikala veća od njihove razgradnje (Kovač Z i Gamulin S, 2011).

Na unutarstaničnoj razini združenim djelovanjem povišena koncentracija kalcija u mitohondriju i ROS doprinose aktivaciji mPTP. Radi se o megakanalu koju premošćuje unutarnju i vanjsku mitohondrijsku membranu. Niski pH za vrijeme ishemije djeluje protektivno, ali povišenjem pH nakon reperfuzije otvaraju se mPTP. Isto tako, tek nastupom reperfuzije stvara se velika količina ROS koji doprinose oštećenju mitohondrija. Prođe li mnogo mitohondrija permeabilitetnu tranziciju, stanica ostaje bez izvora energije ATP, gubi



se i ionska homeostaza stanice, stanica bubri, te uslijedi nekroza. Druga je mogućnost da mitohondrij bubri, puca oslobađajući citokrom c iz intermembranskog prostora, što vodi aktivaciji kaspaza i apoptotičnoj smrti stanice. Stvaranje mPTP je glavni regulator i apoptoze i nekroze u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi (Murphy E i Steenbergen C, 2008).

Na slici 7 prikazan je niz promjena u stanici koje počinju ishemijom, a progrediraju reperfuzijom koja uslijedi. Sve te promjene doprinose staničnoj smrti koja može biti nekroza, apoptoza i autofagija.



Slika 7. Putovi koji uzrokuju staničnu smrt u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi (Murphy E i Steenbergen C, 2008)

Na endotelnim stanicama slobodni radikali nastali tijekom hipoksije djeluju kao vjesničke molekule, te aktiviraju sustav nuklearnog čimbenika  $\kappa B$  (*engl.* nuclear factor  $\kappa B$ , NF- $\kappa B$ ). Posljedično tome povećava se izražaj adhezijskih molekula na membranama endotelnih stanica. Leukociti s obnovom krvotoka dolaze u ishemično područje, prijanjaju na membrane endotelnih stanica posredstvom adhezijskih molekula, te ulaze u hipoksično tkivo. Aktivacijom leukocita razvija se velika količina slobodnih radikala kisika. Respiratorni lanac mitohondrija je jedan od najvažnijih izvora kisikovih radikala u reperfuziji. Slobodni radikali kisika mogu oštetiti sve dijelove stanice- u membranama peroksidiraju nezasićene masne kiseline, oksidiraju sulfhidrilne skupine enzima, depolimeriziraju polisaharide, hidroksiliraju

baze nukleinskih kiselina, te prekidaju njihove lance. Tako dolazi do nepopravljiva oštećenja stanica u području u koje je nakon hipoksije došao kisik (Kovač Z i Gamulin S, 2011).

#### **4.7. Ishemijsko prekondicioniranje**

Ishemijsko prekondicioniranje je pojava da kratka razdoblja ishemije prije infarkta aktiviraju endogene zaštitne mehanizme te povećavaju preživljenje kardiomiocita. Ova je pojava prvi put otkrivena u pasa kod kojih je nakon 4 uzastopne kratke ishemije od po 5 minuta opseg infarkta nastalog 40 minutnom okluzijom krvne žile bio 75% manji. Proces prekondicioniranja veže se uz spoznaju da osobe koje su imale anginozni napadaj u toku 48 sati prije infarkta miokarda imaju daleko manju smrtnost i opseg infarkta, nego osobe bez angine. Pretpostavljeni put djelovanja u osoba s prethodnom anginom je razvoj kolaterala i ishemijsko prekondicioniranje. Postoje dva razdoblja nakon ishemijskog prekondicioniranja u kojima je miokard otporniji na ishemiju. Prvo je razdoblje kratko, unutar 2 sata, u kojemu se preko receptora vezanih uz G protein povećava aktivnost protein kinaze C (PKC), koja se premješta iz citoplazme na plazmatsku membranu i fosforilira proteine, a među njima i ATP-osjetljiv sarkolemalni  $K^+$  kanal ( $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ ). Drugi prozor zaštite javlja se za 24 sata od prekondicioniranja i traje oko 48 sati. Radi se o promjeni ekspresije gena za različite citoprotektivne bjelančevine poput staničnih stresnih bjelančevina (*engl.* heat shock proteina, HSP) i antioksidantnih enzima. Sukladno tome brojna su istraživanja pokazala da blokatori  $K_{\text{ATP}}$  kanala poput glibenklamida (korištenog u terapiji dijabetesa melitusa) dovode do blokade učinka prekondicioniranja. Otkriveno je i da tvari koje aktiviraju adenozijske A1 receptore, te opioidne receptore također dovode do prekondicioniranja. Farmakološko prekondicioniranje se može postići i inhalacijskim anestheticima. Dodatan pozitivan učinak imaju ACE inhibitori, zbog smanjene razgradnje bradikina i pojačane aktivacije receptora za bradikinin- $B_2$ , s pojačanim učinkom ishemijskog prekondicioniranja i kod slabijih ishemijskih podražaja. Mehanizmi prekondicioniranja eksperimentalno su dokazani na životinjama. U kliničkoj praksi se primjenjuje kardioprotekcija inhalacijskim anestheticima tijekom operacija u kojima se može očekivati ishemijsko oštećenje miokarda, i to prema smjernicama strukovnih udruga *American Heart Association* i *American College of Cardiology*. Kod ljudi je prekondicioniranje uočeno na nekoliko primjera, i to nakon 90 sekundnih okluzija koronarne krvne žile balon kateterom, kratkim zatvaranjem krvne žile tijekom CABG operacije ili negativnim učinkom lijekova koji antagoniziraju adenozijske A1 receptore ili zatvaraju  $K_{\text{ATP}}$  kanale (Tomai F i sur., 1999).

## 5. Matične stanice

### 5.1. Definicija

Matične stanice imaju sposobnost neograničenog dijeljenja u kulturi i samoobnavljanja, te diferencijacije u najmanje jedan tip visoko diferencirane stanice (Watt FM i Hogan BL, 2000). Takve sposobnosti imaju zahvaljujući asimetričnoj staničnoj diobi, kojom se proizvodi istovjetna multipotentna jedinka i dodatna progenitorna stanica sa specijaliziranom funkcijom (Sylvester KG i Longaker MT, 2004). Ovisno o vrstama stanica u koje se mogu diferencirati, matične stanice dijelimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne i unipotentne. **Totipotentne** matične stanice imaju sposobnost stvaranja stanica potomaka svih staničnih tipova u tijelu, te svih tipova stanica koje stvaraju ekstraembrionalna tkiva poput placente (amniona, koriona i sl.). **Pluripotentne** matične stanice sposobne su proizvesti sve tipove stanica u tijelu, odnosno sva tri zametna sloja, ali ne mogu proizvesti ekstraembrionalna tkiva. Transplantacijom u imunosuprimiranog primaoca stvaraju teratome. **Multipotentne** mogu proizvesti nekoliko vrsta stanica u tijelu, a **unipotentne** samo jedno, npr. satelitske stanice u skeletnom mišiću (<http://stemcells.nih.gov/>).

### 5.2. Uloga matičnih stanica

U mnogim tkivima matične stanice služe za obnavljanje stanica, dijeleći se bez ograničenja i zamjenjujući druge stanice za cijelog životnog vijeka organizma. Kada se matična stanica dijeli, svaka stanica potomak može postati ili matična stanica ili diferencirana stanica sa specijaliziranom funkcijom, npr. mišićna stanica, eritrocit ili neuron. U nekim organima poput crijeva ili koštane srži matične se stanice stalno dijele kako bi osigurale popravak oštećenih tkiva. S druge strane, u nekim se tkivima matične stanice dijele samo u posebnim okolnostima, kao primjerice u gušterači ili pak u srcu. Iz nekih matičnih stanica, nazvanih embrionalnim matičnim stanicama, koje se nalaze u unutrašnjosti blastociste, nastaje cijeli novi organizam, sa svim njegovim specijaliziranim stanicama (<http://stemcells.nih.gov/>).

### 5.3. Vrste matičnih stanica

**Embrionalne matične stanice** (*engl.* embryonic stem cells, ESC) su nediferencirane stanice derivirane iz unutrašnje mase stanica preimplantacijskih embrija. U kulturi se mogu dugo razmnožavati bez diferencijacije i mogu se razviti u stanice triju primarnih zametnih slojeva.

**Inducirane pluripotentne matične stanice** (*engl.* induced pluripotent stem cells, iPSC) vrsta su pluripotentnih zametnih stanica, sličnih embrionalnim matičnim stanicama. Umjetno se

formiraju uvođenjem čimbenika ili gena pluripotentnosti u somatsku stanicu (npr. u fibroblast) koji reprogramiraju samu stanicu.

**Adultne (somatske ili zrele) matične stanice** su relativno rijetke nediferencirane stanice pronađene u brojnim tkivima i organima s ograničenom sposobnostima samoobnavljanja i diferencijacije u laboratorijskim uvjetima. Identificirane su između ostalog i u mozgu, koštanoj srži, crijevima, krvnim žilama, skeletnim mišićima, koži, zubima, srcu, jetri te epitelu ovarija i testisa. Smatra se da se nalaze u specifičnom području svakog tkiva nazvanom „niša matične stanice“. Postoje dokazi da se u mnogim tkivima zapravo radi o pericitima, stanicama koje sačinjavaju vanjski sloj malih krvnih žila. One miruju dulje vrijeme, ne dijeleći se, sve dok ih potreba za povećanjem broja stanica ili oštećenje tkiva ne aktivira. Te stanice se razlikuju u svome diferencijacijskom kapacitetu, ali on je uglavnom ograničen na stanice koje postoje u ishodišnom organu. Međutim, ponekad se i transdiferencijacijom može postići da te stanice daju potomke specijaliziranih stanica koje nisu karakteristične za tkivo iz kojeg dotične adultne matične stanice potječu (npr. da moždane matične stanice formiraju krvne žile ili da stromalne stanice koštane srži formiraju srčane miocite) (<http://stemcells.nih.gov/>). Adultne matične stanice se dijele na:

- **Matične stanice iz koštane srži** (*engl.* bone marrow stem cells, BMSC) su stromalne matične stanice koštane srži i hematopoetske matične stanice koštane srži.
  - **Stromalne matične stanice koštane srži** (*engl.* mesenchymal stem cells, MSC) su podvrsta stanica u koštanoj srži koje su multipotentne i mogu formirati kost, hrskavicu, stromalne stanice koje podupiru formiranje krvnih stanica, masne i stanice vezivnog tkiva (Ding DC i sur., 2011).
  - **Hematopoetske matične stanice koštane srži** (*engl.* hematopoietic stem cells, HSC) su podvrsta stanica u koštanoj srži koje su multipotentne i mogu formirati sve tri vrste krvnih stanica.
- **Mezenhimalne matične stanice** (*engl.* mesenchymal stem cells, MSC) su adultne matične stanice (osim krvotvornih matičnih stanica) iz brojnih različitih tkiva. Nije posve jasno jesu li MSC strome koštane srži jednake mezenhimalnim stanicama iz drugih izvora.
- **Neuralne matične stanice** u mozgu stvaraju neurone i dvije vrste neneuralnih stanica: astrocite i oligodendrocite.
- **Epitelne matične stanice** se nalaze u dubokim kriptama probavnog sustava i stvaraju neuroendokrine, vrčaste, apsorptivne stanice, te Panetove stanice.

- **Kožne matične stanice** čine bazalni sloj epidermisa i bazu folikula dlake.
- **Satelitske stanice ili skeletni mioblasti** su unipotentne matične stanice koje se nalaze u bazalnoj membrani mišićnih vlakana, mogu se diferencirati samo u miocite, te održavaju homeostazu skeletnih mišića (<http://stemcells.nih.gov/>).

#### 5.4. Progenitorne stanice

Progenitorne su stanice oligopotentne stanice, koje su tijekom svojega razvoja izgubile sposobnost samoobnavljanja i sposobnost diferencijacije u određenim smjerovima. Diferencirani su od matičnih stanica, te bi se slikovito moglo reći da su na pola puta između matičnih stanica i posve diferenciranih stanica. „Potentnost“ koju one imaju ovisi o njihovim roditeljskim stanicama i o niši u kojoj se nalaze (<http://www.copewithcytokines.de/>).

#### 5.5. Povijesni razvoj

Prije više od 30 godina znanstvenici su otkrili kako derivirati embrionalne stanice iz ranih mišjih embrija. Detaljnim upoznavanjem biologije mišjih embrionalnih matičnih stanica 1998. je otkrivena metoda derivacije ljudskih matičnih stanica iz prekobrojnih ljudskih embrija dobivenih *in vitro* fertilizacijom i njihova uzgoja u laboratorijskim uvjetima. Te su stanice nazvane ljudskim embrionalnim matičnim stanicama (*engl.* human embryonic stem cells, hESC) (<http://stemcells.nih.gov/>). Budući da se embrionalne matične stanice dobivaju iz unutarnje mase stanica blastocista, uzgoj ove vrste stanica nosi određene pravne i etičke probleme, ovisno o stavovima o vremenu početka života. Uz to ESC su povezane s tumorigenezom. Zbog ovih nedostataka istraživanja su se usmjerila i na druge vrste matičnih stanica poput adultnih matičnih stanica (Ding DC i sur., 2011). 2006. godine Takahashi i sur. došli su do velikog otkrića da se i neke specijalizirane odrasle stanice mogu reprogramirati u iPS stanice. To je postignuto retrovirusnim unošenjem gena s transkripcijskim faktorima (Oct 3/4, Sox 2, Klf 4 i c-Myc) u mišje embrionalne i odrasle fibroblaste (Takahashi K i Yamanaka S, 2006). Te su stanice nakon izražaja dotičnih gena dobile svojstva embrionalnih matičnih stanica, morfološki izgled, površinske markere, a formirale su i tumore od sva tri zametna sloja prilikom transplantacije ispod kože miša (ESC). 2007. godine iPS stanice proizvedene su i od ljudskih fibroblasta, koristeći istu (Takahashi K i sur., 2007) ili sličnu kombinaciju faktora reprogramiranja (OCT4, NANOG, SOX2 i LIN28) (Yu J i sur., 2007). Budući da i iPS stanice imaju nedostatke pri transplantaciji, poput formiranja tumora i nedostatne diferencijacije, postoje metode kojima se pokušava pribaviti što veća količina mezenhimalnih matičnih stanica- iz menstruacijske krvi, endometrija, endometralnih polipa, jajovoda, križnih

ligamenata koljena, matriksa pupčane vrpce koje bi se koristile za regeneraciju. Ovisno o genetskim događanjima, transkripcijskim faktorima i mikrokolini MSC se mogu diferencirati u endodermalna, mezodermalna i ektodermalna tkiva (Ding DC i sur., 2011). Istraživanja na području adultnih matičnih stanica započela su još 1950-ih godina, kada je otkriveno da se koštana srž sastoji od dva tipa matičnih stanica- hematopoetskih (iz kojih se stvaraju sve krvne stanice) i stromalnih (iz kojih nastaju koštane stanice, hondrociti, adipociti, stanice vezivnog tkiva). Adultne matične stanice upotrebljavaju se u terapiji već 45 godina, kao transplantacija matičnih stanica koštane srži. Međutim, u tkivima je vrlo malen broj adultnih matičnih stanica, te se ove stanice slabo dijele u kulturi, što onemogućuje stvaranje velikog broja matičnih stanica. Ostaje nepoznato koliko adultnih matičnih stanica postoji, u kojim tkivima se one nalaze, kako nastaju i da li su to zaostatci embrionalnih matičnih stanica. Postavlja se pitanje zašto baš te stanice ostaju nediferencirane, kada su sve ostale stanice oko njih diferencirane i postoji li neka niša koja kontrolira njihovo ponašanje? Nadalje, nepoznato je koji su faktori koji kontroliraju njihovu proliferaciju i diferencijaciju, te koji im je kapacitet transdiferencijacije, koji ih faktori vode k mjestu ozljede ili oštećenja, te kako one povoljno djeluju prilikom transplantacije – trofički, preko direktnog međustaničnog kontakta, sekrecijom nekih čimbenika ili na neki drugi način.

U terapiji ishemijskog moždanog udara štakora s MSC dokazano je da one svoj povoljan učinak barem jednim dijelom postižu izlučujući TGF- $\beta$ . U ishemičnom moždanom udaru jako je povišen monocitni kemotaktički protein (*engl.* monocyte chemoattractant protein, MCP-1), kemoatraktant za monocite/makrofage, koji onda ulaze u oštećeno područje kroz oštećenu krvno moždanu barijeru. Pokazano je da TGF- $\beta$  kojeg seceniraju MSC smanjuje proizvodnju MCP-1 i posljedičnu infiltraciju upalnih stanica u ishemično područje. U prilog tome govori i činjenica da u prisutnosti anti-TGF- $\beta$  protutijela ili pak kod MSC kojima je nokautirana proizvodnja TGF- $\beta$  izostaje ovaj pozitivan efekt MSC (Yoo SW i sur., 2013).

## **5.6. Sličnosti i razlike embrionalnih i adultnih matičnih stanica**

U regenerativnoj medicini i embrionalne i adultne matične stanice imaju svojih prednosti i nedostataka. Glavna je razlika u broju i tipovima stanica u koje se mogu diferencirati. Embrionalne stanice su pluripotentne, te mogu postati bilo koji tip stanice u tijelu. Adultne su stanice limitirane na tipove stanica organa iz kojeg potječu. Embrionalne se stanice lako uzgajaju u kulturi. Adultne su stanice rijetke u tkivima, te ih je veliki izazov iz njih izolirati, a ne postoje ni dobre metode za njihovo umnožavanje u staničnoj kulturi. Te dvije vrste mogle

bi se razlikovati i u izazivanju transplantacijske reakcije. Dok bi embrionalne stanice mogle izazvati transplantacijsku reakciju, to je manje vjerojatno za adultne matične stanice. One bi se uzele iz samoga pacijenta, diferencirale u kulturi i vratile u pacijenta, što smanjuje mogućnost imunosnog odbacivanja. Imunosno odbacivanje alogeničnih stanica može se spriječiti uvođenjem imunosupresijske terapije, međutim ona nosi svoje negativne posljedice. Treća vrsta matičnih stanica koja obećava u regeneracijskoj terapiji, iPS stanice, su pluripotentne poput ESC-a, te se individualizirano proizvode iz somatskih stanica samoga pacijenta, što znači da su HLA podudarne. Međutim zbog mogućih epigenetskih i genetskih abnormalnosti ove stanice mogle bi uzrokovati tumorigeničnost i imunogeničnost *in vivo* (de Almeida PE i sur., 2013). Imunogeničnost ESC i iPS stanica transplantacijom u imunokompetentnog primaoca uzrokuje odbacivanje, dok kod imunosuprimiranoga primaoca može dovesti do stvaranja teratoma. Također, budući da se neke iPS stanice proizvode unošenjem gena za reprogramiranje pomoću virusa, taj proces se mora pažljivo kontrolirati i testirati ukoliko be se primijenio na ljudima. Bolja alternativa je razvoj drugih tehnika dostave reprogramirajućih faktora poput plazmida ili ubacivanje samih proteina što bi isključilo korištenje virusa (<http://stemcells.nih.gov/>).

### **5.7. Upotreba matičnih stanica**

Matične se stanice danas istražuju u svrhu proučavanja kompleksnog sustava promjena koji se javlja tijekom razvoja nove jedinke. Neka od najtežih stanja u medicini, poput urođenih razvojnih defekta i razvoja tumora javljaju se uslijed abnormalnog dijeljenja i diferencijacije stanica. Razumijevanje genetike i molekularne podloge nastanka tih bolesti može pružiti uvid u nove metode liječenja. Ljudske matične stanice trenutno se koriste i za testiranje novih lijekova. Novi se lijekovi testiraju na diferenciranim stanicama deriviranim iz pluripotentnih staničnih linija. Danas možda najbitnije područje uporabe matičnih stanica je stvaranje novih stanica i tkiva za potrebe regenerativne medicine. Često se transplantiraju tkiva i organi kako bi se nadomjestilo oštećeno ili uništeno tkivo, međutim potrebe višestruko nadilaze dostupnu količinu tkiva i organa. Matične stanice, ukoliko bi se uspješno mogle diferencirati u specifične stanice nude mogućnost stvaranja obnovljivog izvora zamjenskih stanica i tkiva u liječenju bolesti poput Alzheimerera, ozljede leđne moždine, moždanog udara, opeklina, srčane bolesti, dijabetesa, osteoartritisa i reumatoidnog artritisa (<http://stemcells.nih.gov/>).

### **5.8. Matične stanice prikladne za terapiju**

Preduvjet korištenja terapije matičnim stanicama na području regenerativne medicine je stvaranje reproducibilne tehnike rukovanja matičnim stanicama, kako bi se postigla uspješna diferencijacija, transplantacija i prihvatanje u primatelja. Matične stanice treba dovesti u stanje ekstenzivnog dijeljenja, da bi se generiralo dovoljne količine stanica koje bi stvorile tkivo, razviti putove diferencijacije u željeno tkivo, osigurati preživljavanje u primatelju nakon transplantacije, integraciju u okolno tkivo, prikladno funkcioniranje tijekom primateljeva života, bez štete za primatelja u bilo kojem pogledu (<http://stemcells.nih.gov/>). Također ne smije biti etičkih dvojbi vezano uz način pribavljanja i rukovanja matičnim stanicama.



## 6. Srčane matične stanice (CSC)

### 6.1. Otkriće srčanih matičnih stanica

Kao što je već spomenuto, brojna tkiva sadrže određen mali broj adultnih matičnih stanica, koje miruju u svojim nišama i čija je najvjerojatnija funkcija obnavljanje oštećenja tkiva u kojemu se nalaze. Cijelo prošlo stoljeće smatralo se da je srčano tkivo terminalno diferencirano postmitotičko tkivo, da je broj kardiomiocita definiran već pri rođenju i perzistira tijekom cijelog života organa i organizma. Međutim, otkriće c-kit pozitivnih srčanih matičnih stanica (*engl.* cardiac stem cells, CSC) koje žive u srcu i diferenciraju se u brojne stanične linije, korjenito mijenja naše razumijevanje biologije miokarda (Beltrami AP i sur., 2003). One su u srcu relativno rijetke, te se nalazi jedna c-kit pozitivna CSC na otprilike 30 000 stanica u srcu (miocita i ne-miocita). CSC su smještene u nišama, koje kontroliraju njihov fiziološki obrtaj, rast, te migraciju i diferencijaciju onih koje napuštaju niše i zamjenjuju umiruće miokardijalne stanice (Leri A i sur., 2011). Iako je nađeno više kategorija progenitornih stanica u srcu, c-kit pozitivne stanice su jedine do sada otkrivene koje imaju biološka i funkcionalna svojstva tkivno specifičnih adultnih matičnih stanica.

### 6.2. Uloga srčanih matičnih stanica

Smrt i regeneracija miocita u srcu događaju se nepredvidljivo, pri čemu vrijeme najvećeg broja staničnih smrti ne mora odgovarati vremenu maksimalne regeneracije miocita. Kod zatajivanja srca s vremenom se smanjuje broj novonastalih miocita i povećava se broj odumrlih. Zanimljivo je da se broj miocita može vratiti u normalu ili čak povećati, međutim to ne doprinosi oporavku funkcije, smanjenju radnog opterećenja, niti anatomskoj restituciji (Leri A i sur., 2011).

### 6.3. Vrste srčanih matičnih stanica

Do sada je otkriveno sedam vrsta CSC: C-kit<sup>+</sup>, kardiosfere, Sca-1, *side population*, Islet-1, epikardijalne i SSEA-1. Njihovo razvojno podrijetlo i međuodnosi nisu posve razjašnjeni.

**c-kit<sup>+</sup> CSC** najistraženije su srčane matične stanice. Izolirane su 2003. godine iz srca miša (Beltrami AP i sur., 2003). Te su stanice klonigenične, multipotentne i sposobne za samo-obnavljanje *in vivo* i *in vitro*. Nakon izolacije stvaraju kardiomiocite, glatke mišićne stanice i endotelne stanice. Nekoliko godina kasnije pronađene su u ljudi i dokazano je da imaju iste karakteristike (Bearzi C i sur., 2007). Kod neonatalnih miševa ove su se stanice sposobne usmjereno diferencirati *in vitro*, međutim njihova se sposobnost stvaranja kardiomiogenog

fenotipa s vremenom postupno gubi. Nove studije pokazuju da podržavaju postinfarktnu miogenzu u neonatalnih miševa, ali ne i u odraslom srcu (Jesty SA i sur., 2012). I u ljudi su te stanice najobilnije u neonatalnom periodu, te se s vremenom ubrzano smanjuje njihov broj. Kako bi bile pogodne za terapijsku primjenu, potrebno je dobiti njihov veliki broj. Razvijena je metoda magnetski aktiviranog sortiranja stanica iz uzoraka aurikule atrijske, kojom se jednostavno i jeftino mogu izolirati i umnožiti te stanice, s relativno velikim udjelom CSC (He JQ i sur., 2011). Mehanizam pozitivnog učinka c-kit<sup>+</sup> stanica uključuje i diferencijaciju u kardiomiocite i parakrine učinke. Među parakrinim učincima otkriveni su oni posredovanjem čimbenika rasta sličnog inzulinu (*engl.* insulin-like growth factor 1, IGF-1) (Kawaguchi N i sur., 2010).

**Kardiosfere** su izoliranje iz srca glodavaca i uzoraka biopsije ljudskog srca. Te stanice imaju sposobnost samoobnavljanja, klonogenične su i mogu se diferencirati u kardiomiocite. Radi se o nakupini (*engl.* cluster) c-kit<sup>+</sup> stanica u središtu, s periferijom diferenciranih stanica (srčanih, vaskularnih, endotelnih i mezenhimalnih). To su trodimenzionalne strukture koje stvaraju mikrookoliš sličan onome u nišama matičnih stanica, što favorizira njihovo preživljenje i funkcionalno poboljšanje. Disocijacijom kardiosfere u pojedine stanice ti se pozitivni učinci gube. Stanice koje nastaju disocijacijom kardiosfere zovu se iz kardiosfere derivirane stanice (*engl.* cardiosphere derived cells, CDC). Baš kao i c-kit<sup>+</sup> stanice, kvaliteta kardiosfera opada s dobi te su u neonatalnom razdoblju najkvalitetnije. Tome bi mogla doprinjeti i veća koncentracija citokina u neonatalnom organizmu, te veći broj matičnih stanica (Leri A i sur., 2011).

**Sca-1<sup>+</sup>** srčane progenitorne stanice su adultne matične stanice pronađene u miša. Ljudski ortolog nije nađen (Leri A i sur., 2011).

**Side population** srčane progenitorne stanice nađene su u ljudi. U osoba s ishemičnim miokardom brojnije su od c-kit<sup>+</sup> stanica (Zhang H i sur., 2014).

**Is11<sup>+</sup>** srčane progenitorne stanice jedne su od rijetkih stanica za koje se zna razvojna osnova. One su autentični, endogeni progenitori srca (kardiomioblasti), te se iz njih razvija drugo srčano polje. Te se stanice mogu lako umnožavati prije diferencijacije u tri glavne vrste srčanih stanica (endotelne, glatkomišićne stanice i kardiomiocite). Ne koriste se u popravku srca budući da bi mogli dovesti do diferencijacije u nepoželjne vrste stanica, što bi moglo dovesti do nepovoljnih učinaka (Zhang H i sur., 2014).

**Epikardijalne** srčane progenitorne stanice, pokazuju regenerativni kapacitet u miša, no njihov je broj nedovoljan da bi nadomjestio kardiomiocyte infarciranog srca (Zhang H i sur., 2014).

**SSEA<sup>+</sup>** srčane progenitorne stanice brojne su u odraslom srcu štakora, mogu se diferencirati u endotelne, glatkomišićne stanice i kardiomiocyte (Zhang H i sur., 2014).

## **7. Transplantacija matičnih stanica u terapiji infarkta**

Dvije su osnovne vrste stanica koje se transplantiraju u srce: egzogene i endogene. Brojne egzogene stanice uključuju totipotentne/pluripotentne ESC, iPSC te adultne matične stanice limitiranog potencijala kao što su rezidentne srčane matične stanice, cirkulirajuće progenitorne stanice i adultne matične stanice iz drugih tkiva. Stanice kandidati za transplantaciju mogu zamijeniti kardiomiocyte i/ili poboljšati srčanu funkciju. U idealnom slučaju te stanice moraju biti imunokompatibilne sa srcem donora i funkcionalno se integrirati s ostatkom miokarda.

Za transplantaciju matičnih stanica prilikom terapije zatajenja srca koriste se ESC, iPSC, BMSC i MSC. Svaka od njih ima vlastite karakteristike, prednosti i nedostatke.

### **7.1. Matične stanice koštane srži (BMSC)**

BMSC su najistraženije među matičnim/progenitornim stanicama u terapiji ishemijski oštećenog miokarda. U koštanoj srži postoje dvije skupine različitih matičnih stanica, kako je već opisano, hematopoetske progenitorne/matične stanice (HSC) i stromalne odnosno mezenhimalne matične stanice (MSC).

#### **7.1.1. Mezenhimalne matične stanice (MSC)**

MSC koje mogu biti izolirane ne samo iz koštane srži, nego i iz drugih tkiva (masnog tkiva, pupčane vrpce, menstrualne krvi, endometralnih polipa, endometrija, križnih ligamenata) (Ding DC i sur., 2011), te ih je relativno jednostavno pribaviti. Posjeduju pozitivne stromalne markere (CD44, CD49d, CD90 i CD166), negativne hematopoetske markere (CD14, CD45, CD34) i negativne endotelne markere (VEGFR2, CD34, CD105) (Feng Y i sur., 2012). Profil njihovih adhezijskih molekula razlikuje se od jednog do drugog davaoca, te ovisi o mediju korištenom za uzgoj stanica (Ding DC i sur., 2011). Ne pretvaraju se direktno u kardiomiocyte, već svoje pozitivne efekte postižu parakrinim djelovanjem. Tome u prilog govore i slični učinci postignuti injiciranjem medija iz kulture BMSC-a, kao i samih BMSC. Ovaj bi podatak mogao doprinjeti korištenju paradigme liječenja IM bez korištenja samih stanica (Feng Y i sur., 2012). Smatra se da brojni faktori koje izlučuju trombociti i monociti, među kojima su i VEGF-A, PlGF i SDF-1 aktiviraju matriks metaloproteinazu 9 (MMP-9) i uzrokuju mobilizaciju HSC, MSC, EPC. Zbirne interakcije ovih stanica doprinose procesu revaskularizacije (Ding DC i sur., 2011). Uz ove stanice se veže još jedan zanimljiv fenomen. Naime, injiciranjem u krv štakora pokazano je da se one endogeno „utklivljuju“ u specifičnim tkivima (npr. plućima), dok ih se u drugima ne može naći (npr. u mozgu). Modeli vaskularne i

miokardijalne ozljede govore da bi za to specifično usmjeravanje mogli biti odgovorni povećanje čimbenika 1 deriviranog iz stromalne stanice (*engl.* stromal cell derived factor 1, SDF-1) u infarciranom miokardu i udomljavanje stanica koje eksprimiraju receptor za SDF-1 (CXCR4). Ovaj faktor i njegov receptor ključni su u zadržavanju ovih stanica u koštanoj srži, mobilizaciji i udomljavanju. Različite vrste tkiva variraju u ekspresiji receptora, što znači da njihov afinitet udomljavanja ovisi o vrsti tkiva. G-CSF povećava migraciju matičnih stanica prema SDF-1 (Ding DC i sur., 2011), a povećanjem ekspresije CXCR4 može dovesti i do poboljšanja migracije i prihvatanja u ciljnom tkivu, u što je uključena i regulacija na gore matriksne metaloproteinaze (*engl.* matrix metalloproteinase, MMP) (Feng Y i sur., 2012). U mišjem modelu pozitivnim efektima nakon ishemije noge MSC su doprinjele izlučivanjem fibroblastnog čimbenika rasta 2 (*engl.* fibroblast growth factor 2, FGF2), VEGF i čimbenika rasta posteljice (*engl.* placental growth factor, PlGF). Ove se stanice mogu i genetski modificirati da eksprimiraju kinazu Akt2 koja potiče preživljavanje. Ona izlučuje sFRP2 (*engl.* secreted frizzled-related protein 2), koji je Wnt antagonist i čini kardiomiocite otpornijima na apoptozu induciranu hipoksijom i poboljšava funkciju miokarda. (Feng Y i sur., 2012). Za MSC se vjeruje da su imunoprivilegirane, što je povećalo njihovu uporabu kod alogeničnih primaoca. (Feng Y i sur., 2012) Njihov snažan imunomodulatorni efekt se očituje inhibicijom proliferacije i funkcije limfocita T, B i NK stanica, kao posljedica inhibicije ciklina D2 (Ding DC i sur., 2011).

Istraživanje na štakorima s transmuralnim infarktom LAD, kojima je u periinfarktnu zonu injektirano  $1 \times 10^7$  autogenih MSC, pokazalo je da 2 mjeseca nakon implantacije nastaje funkcionalno i histološko poboljšanje, pojačana ekspresija angiogenetskih faktora i regulacija na dolje proapoptotskih enzima. Bojenje 5-brom-2-deoksiuridinom je pokazalo da se transplantirane stanice doista nalaze u ishemičnom miokardu. Gustoća kapilara se povećala 40% u usporedbi s kontrolom kojoj je injektiran samo medij. Neke od transplantiranih MSC su se ugradile i u novostvorene krvne žile. U usporedbi s kontrolama transplantirana su srca imala značajno veće koncentracije osnovnog fibroblastnog čimbenika rasta (*engl.* basic fibroblast growth factor, bFGF) i VEGF. Također su imali 60% manje Bax proapoptotičkog proteina. Kontraktilna funkcija je bila 49% u eksperimentalnoj prema 19% u kontrolnoj skupini (Tang YL i sur., 2005). I ostala istraživanja na štakorima i svinjama nakon IM pokazala su poboljšanje funkcije srca uslijed poboljšanja vaskularizacije u injiciranim području, ali bez formacije novih kardiomiocita.

Provedena su brojna klinička istraživanja i sveukupni rezultati pokazuju da u usporedbi s kontrolom terapija s MSC povisuje ejeckijsku frakciju lijevog ventrikula (*engl.* left ventricular ejection fraction, LVEF) za 2.99% [95% CI 1.26-4.72%,  $P=0.0007$ ], značajno smanjuje krajnji dijasolički volumen lijevoga ventrikula (*engl.* left ventricular end diastolic volume, LVEDV) za 4.74 mL [95% CI 1.64-7.84 mL,  $P=0.003$ ] i smanjuje leziju miokarda za 3.51% [95% CI 1.11-5.91%,  $P=0.004$ ] (Zhang H i sur., 2014). Međutim, u kliničkim istraživanjima najjači pozitivni efekt pokazuje 14% povećanje ejeckijske frakcije (EF) nakon intrakoronarne aplikacije velikoga broja autoložnih MSC (Chen SL i sur., 2004). Intravenska pak primjena alogeničnih hMSC (CD105<sup>+</sup> i CD 166<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>), dobivenih iz HLA nekompatibilnog davaoca, 10 dana nakon infarkta, dobro je tolerirana, smanjivala je aritmije i smanjila kontraktilnu disfunkciju u odnosu na skupinu tretiranu placebom. U tijeku praćenja od 12 mjeseci LVEF mjerena magnetnom rezonancijom srca (*engl.* cardiac magnetic resonance imaging, cMRI) se povećala za  $5.2 \pm 1.99\%$  ( $P=0.003$ ) u odnosu na placebom tretiranu skupinu (Hare JM i sur., 2009).

### **7.1.2. Hematopoetske matične stanice (HSC)**

Lavinu istraživanja vezanih uz hematopoetske progenitorne/matice stanice pokrenula je objava rada Orlic D. i suradnika, da se primjenom hematopoetskih matičnih stanica injiciranih u rubnu zonu infarkta miokarda one diferencijaciju u kardiomiocyte (Orlic D i sur., 2001). Međutim, ovo otkriće nije bilo potvrđeno budućim istraživanjima, već se pokazalo da se ove stanice postaju zrele krvne stanice. Unatoč izostanku stvaranja kardiomiocita ova je terapija u brojnim studijama ipak pokazala poboljšanja srčane funkcije, implicirajući parakrini mehanizam svojih učinaka. Stoga je napravljen veći broj kliničkih istraživanja 1., 2. i 3. faze u kojima su transplantirane autologne stanice koštane srži pacijentima sa zatajenjem srca ili pak s akutnim infarktom miokarda. Najveći među tim istraživanjima su randomizirani, placebom kontrolirani pokusi REPAIR-AMI (Schaechinger V i sur., 2006) i BOOST (Wollert KC i sur., 2004). REPAIR-AMI pokazao je da intrakoronarna infuzija stanica deriviranih iz koštane srži smanjuje broj negativnih ishoda nakon godine dana i dovodi do poboljšanja funkcije lijevog ventrikula. S druge strane u BOOST studiji injiciranje mononuklearnih stanica iz koštane srži (mBMC), 24 h nakon PCI, kod pacijenata s akutnim infarktom miokarda (AMI) nije dovelo do funkcionalnog poboljšanja nakon 18 mjeseci, ali je smanjena veličina ožiljka i poboljšano gibanje srčane stijenke. Kasnija metaanaliza 18 randomiziranih i nerandomiziranih pokusa na 999 pacijenata s AMI i kroničnim zatajenjem srca (CHF) (Abdel-Latif A i sur., 2007) pokazala je da transplantacijom odraslih stanica koštane srži dolazi do poboljšanja ejeckijske

frakcije za 5.4%, veličina ožiljka se smanjuje za 5.49%, a LVEDV za 4.8mL. Ova istraživanja pokazuju da su primijenjene metode provedive i sigurne, ali uz skromne učinke. Međutim, teško je donositi relevantne zaključke, budući da se radi o malim uzorcima pacijenata, heterogenom dizajnu istraživanja, različitim vrstama stanica koje su istraživane, različitim putevima primjene stanica i vremenu primjene stanica. Posebnu pažnju treba obratiti na mBMC. Većinom se radi o nefrakcioniranim stanicama koštane srži, gdje >99% stanica čine nezreli granulociti i hematopoetske linije, ne matične stanice. U većini injektiranih mješavina stanica hematopoetskih progenitornih stanica s markerima CD34 ili CD133 ima relativno malo, između 0.1 i 5%. Zbog njihova tako mala broja teško je tvrditi da samo one doprinose terapijskim učincima ovih stanica (Feng Y i sur., 2012). U tablici 2. sažeta su do danas završena klinička istraživanja presadbe stanica koštane srži u terapiji AMI-a ili CHF-a.

Tablica 2. Klinička istraživanja s BMSC (www. clinicaltrials.gov)

Naziv studije	Uključeni pacijenti	Klinička faza	Godina završetka	Istraživana vrsta stanica	Metoda primjene SC	Istraživani ishodi	Metoda praćenja
Autologous Stem Cell Transplantation in AMI ( <b>ASTAMI</b> )	2-3 h nakon AMI	I	2006.	Autologne mBMC	Intrakoronarno za vrijeme PCI	Efikasnost kvaliteta života	EKG, SPECT, ergometrija, SF36 formular
Combination Stem Cell <b>MESENDO</b> therapy for Utilisation and Rescue of Infarcted Myocardium	CHF, AMI u zadnjih 12 mj.	I	2009.	Autologne BMSC	Intrakardijalna infuzija za vrijeme CABG	Sigurnost, efikasnost	SPECT, UZV srca
Bone Marrow Stem Cell Infusion Following a Heart Attack	2-7 dana nakon AMI	I	2010.	Autologne mBMC	Intrakoronarno	Sigurnost, efikasnost	Holter, lab, MRI
Safety and efficacy of Intracoronary Adult Human MSC after AMI ( <b>SEED-MSC</b> )	AMI	II i III	2010.	Autologne MSC	Intrakoronarno	Sigurnost, efikasnost	SPECT
Prospective Randomised study of Mesenchymal stem cell therapy in Patients Undergoing cardiac surgery ( <b>PROMETHEUS</b> )	CHF	I i II	2011.	Autologne MSC	Intrakardijalna injekcija tijekom CABG	Sigurnost, efikasnost	MRI, UZV, holter CK, troponin, NYHA, MLHF
Bypass surgery and CD133 Marrow Cell injection for treatment of Ischaemic Heart Failure ( <b>Cardio 133</b> )	CHF	II i III	2011.	CD133 stanice koštane srži	Intrakardijalna injekcija tijekom CABG	Efikasnost	MRI, NYHA
Use of Adult Autologous SC in Treating People Who Have Had a Heart Attack ( <b>The TIME study</b> )	3 i 7 dana nakon AMI	II	2012.	Autologne mBMC	Intrakoronarno	Sigurnost	EKG, MRI
Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis Pilot Study ( <b>The POSEIDON Pilot Study</b> )	CHF	II i III	2012.	Autologne MSC i alogene MSC	Transendokardijalna injekcija tijekom kateterizacije	Sigurnost, efikasnost	CT, UZV
The Transendocardial Autologous Cells Human MSC and BMC in Ischaemic heart failure trial ( <b>TAC-HFT</b> )	CHF	I i II	2012.	autologne MSC i BMSC	Transendokardijalna injekcija tijekom kateterizacije	Sigurnost, efikasnost	MRI, UZV

\*mBMC – mononuklearne stanice koštane srži



Iz priložene tablice vidimo da je proveden velik broj kliničkih istraživanja faze 1, 2 i 3 s različitim vrstama stanica, različitim putevima primjene i neusuglašenim metodama praćenja rezultata (SPECT, MR, UZV, EKG, holter, NYHA, itd.). Prema tražilici na stranici [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) ukupno ima 34 kliničke studije koje se bave transplantacijom matičnih stanica u terapiji infarkta miokarda. Ovdje su navedena završena istraživanja (9), međutim, još ih je mnogo u tijeku ili nepoznatog statusa (24), te je jedno prekinuto.

## **7.2. Embrionalne matične stanice (ESC)**

Pribavljanje, istraživanje i upotreba ESC stanica u liječenju podliježe etičkim dilemama, iako je njihova primjena pokazala dobre rezultate na životinjama (Zhang H i sur., 2014). Uspješna izolacija ovih stanica 1990-ih kamen je temeljac svim terapijama koje se baziraju na transplantaciji stanica. Imaju sposobnost neograničenog samoobnavljanja i među ostalim stvaranja kardiomiocita. Dosadašnja saznanja prikupljena su iz istraživanja na životinja, pretežno glodavcima i svinjama. Mišje embrionalne stanice diferencirane u kardiomiocyte (*engl.* murine embryonic cells derived cardiomyocytes, mES-CM) transplantirane u zdravo mišje srce pokazale su sposobnost stvaranja stabilnih intrakardijalnih graftova, a u modelima nakon IM su pokazale poboljšanje srčane funkcije. S druge strane, deriviranje kardiomiocita iz ljudskih embrionalnih stanica (hESC) mnogo je zahtjevnije, dok je spontana diferencijacija hESC u kardiomiocyte spora. Upotreba aktivina A i koštanog morfogenetskog proteina 4 (*engl.* bone marrow protein 4, BMP4) za 30% poboljšava diferencijaciju hESC u kardiomiocyte. Također je bitan problem preživljavanje stanica u srčanom tkivu nakon transplantacije. Smrt transplantiranih stanica nastupa uslijed ishemije, zbog transplantacije u ishemično područje, anoikisa odnosno programirane smrti stanica uslijed odvajanja stanica od podloge tj. ekstracelularnog matriksa i zbog faktora povezanih s upalom – slobodnih radikala, citokina i NK stanica. Kako bi se potaknulo preživljenje transplantiranih stanica, upotrebljavaju se različiti kokteli sačinjeni od Matrigela koji sprječava anoikis, peptida Bcl-XL koji blokira mitohondrijsku smrt stanice, ciklosporina A koji inhibira mitohondrijske puteve ovisne o ciklofilinu D, pinacidila koji otvara ATP ovisne K<sup>+</sup> kanale i oponaša prekondicioniranje, IGF-1 koji aktivira Akt puteve te inhibitor kaspaze ZVAD-fmk. Ovaj je koktel poboljšao i preživljenje i veličinu grafta hESC-CM u miševa. Svi ovi faktori ne djeluju pojedinačno, međutim korišteni zajedno daju dobre rezultate, što upućuje da su mehanizmi smrti transplantiranih stanica u miokardu brojni i različiti (Laflamme MA i sur., 2007).

Zanimljiva su istraživanja na životinjama sa sporim srčanim ritmom ili s totalnim AV blokom. U njih su hESC-CM zamijenili stanice pacemakera, te uzrokovali ektopičan ritam kompatibilan s preživljenjem životinje (Kehat I i sur., 2004). To istraživanje ukazuje da su kardiomiociti derivirani iz embrionalnih stanica sposobni stvoriti propusne veze (engl. gap junctions) sa stanicama domaćinova miokarda, te se uključiti u električnu aktivnost srca domaćina. Međutim, reparacija lijevog ventrikula kardiomiocitima zahtjevniji je zadatak od stvaranja pacemakera, i zahtjeva 1000 puta više stanica. Primjena hESC u srce imunosuprimiranog miša s neozlijeđenim srcem u 90% slučajeva je rezultirala prihvaćanjem grafta, međutim u infarciranih srca samo kod 18% su se mogli detektirati hESC. Diferencirani kardiomiociti dobiveni iz hESC, transplantirani u srce imunosuprimiranog miša nakon umjetno proizvedenog infarkta prednje stijenke, omogućili su popravak srčane strukture i funkcije nakon infarkta. hESC-CM bili su locirani ne samo u periinfarktnoj zoni, nego i u središnjem području infarkta, pokazujući tako dobru prilagodbu na neprijateljsko okruženje u samom ožiljku.

U srcu transplantiranih miševa nađene su i ljudske endotelne stanice koje su se povezale s mišjim endotelnim stanicama stvarajući nove kapilare. Ljudske stanice nisu bile pronađene u drugim organima, osim u srcu. U svih je štakora kontrolne i eksperimentalne grupe poslije infarkta porastao polumjer lijevog ventrikula na kraju diastole (engl. left ventricular end diastolic diameter, LVEDD), a smanjila se sistolička funkcija lijevog ventrikula (LV), međutim u grupi s transplantiranim hESC-CM te su promjene bile manje izražene. Postoje naznake da su se hESC-CM sinkronizirali s ritmom kontrakcija ostatka miokarda i tako doprinjeli poboljšanju sistoličke funkcije. Također se čini da su ove stanice parakrinim mehanizmom potakle preživljenje kardiomiocita domaćina, angiogenezu, poboljšale izvanstanični matriks i modulirale imunosni odgovor (Laflamme MA i sur., 2007). Ovi su uspješni eksperimenti na životinjama poticaj za daljnja istraživanja, no prije uporabe hESC-CM u kliničkim istraživanjima treba riješiti nekoliko problema. Moraju biti upotrijebljeni vrlo pročišćeni pripravci diferenciranih kardiomiocita, a ne samih hESC zbog rizika stvaranja teratoma. Zbog toga je potrebno dogovoriti uniformne protokole kojima će se to postići. Također će biti potrebno razviti protokole kojima će se zaobići imunosna reakcija, budući da se te stanice dobivaju iz alogeničnih *in vitro* fertiliziranih embrija. Treba uzeti u obzir i elektrofiziološke posljedice i funkcionalnu integraciju tih stanica s primateljem (Feng Y i sur., 2012). Značajna su i etička ograničenja. U većini zemalja se ne dozvoljava stvaranje novih hESC linija već se omogućava korištenje postojećih. Postoji mogućnost stvaranja aritmija

koje bi se mogle pojaviti u ljudi koji imaju sporiji srčani ritam, jer je moguće da brz srčani ritam srca štakora maskira povratne provodne putove (Laflamme MA i sur., 2007).

### **7.3. Inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC)**

Dobivanje iPSC reprogramiranjem adultnih somatskih stanica u pluripotentne stanice jedno je od najznačajnijih otkrića na području istraživanja matičnih stanica u zadnjih nekoliko godina (Takahashi K i Yamanaka S, 2006). Postoji mnogo istraživanja koja pokazuju da kardiomiociti derivirani iz iPS stanica imaju elektrofiziološke, funkcijske i mikrostrukturne sličnosti s nativnim kardiomiocitima (Yu T i sur., 2013). Budući da se nakon transplantacije mogu aktivirati neki geni iz virusa ili pak onkogeni (koji su uneseni samom metodom reprogramiranja radi unošenja čimbenika pluripotentnosti), prije kliničke upotrebe ovih stanica nužno je pronaći protokole kojima će se reprogramiranje postići bez prisustva virusa. Nedavno su uspjehe u tome polučili transpozoni, episomi i mikro RNA, te direktni putevi dostave proteina (Feng Y i sur., 2012). Također je potrebno provesti još translacijskih istraživanja da bi se sa sigurnošću utvrdilo da su potomci ovih stanica korišteni u terapiji funkcionalni, netumorigenični, stabilni, da se ne dediferenciraju i ne uzrokuju imunosne odgovore koji bi ugrozili njihov opstanak *in vivo*. Potrebno je produbiti znanja o biologiji, genetici i epigenetici iPSC. Unatoč prvotnom oduševljenju da će ove stanice biti odličan izvor autolognih stanica za staničnu terapiju, pokazalo se da one mogu imati genetske i epigenetske abnormalnosti koje bi mogle uzrokovati imunogeničnost i tumorigeničnost *in vivo* (de Almeida PE i sur., 2013).

### **7.4. Srčane matične stanice (CSC)**

Dvije od sedam vrsta CSC stanica, C-kit<sup>+</sup> i kardiosfere, prošle su klinička istraživanja faze I, te pokazuju obećavajuće rezultate. Štoviše, istraživanja pokazuju da bi se CSC mogle u *in vivo* uvjetima pretvoriti u kardiomiocite (Zhang H i sur., 2014).

**C-kit<sup>+</sup> CSC** istraživane su u kliničkom istraživanju faze I nazvanom SCIPIO [Stem Cell Infusion in Patients with Ischaemic cardiomyopathy], završenom 2011 (Bolli R i sur., 2011). Ova studija testirala je sigurnost i efikasnost autolognih C-kit<sup>+</sup> CSC kao dodatne terapije u ljudi s kroničnom ishemičkom kardiomiopatijom koji podliježu CABG operaciji. Cilj je bio prvenstveno procijeniti sigurnost ove metode, te sekundarno efikasnost pomoću UZV srca i cMRI. Studija je bila otvorenog dizajna (nije bilo provedeno zaslijepljivanje), ali osobe koje su izvodile UZV preglede pacijenata nisu znale da li je pacijent primio CSC ili je bio u kontrolnoj skupini. Istraživanje je provedeno na 23 pacijenta: 16 u eksperimentalnoj i 7 u

kontrolnoj skupini. Pacijentima je za vrijeme CABG operacije uzeto 1 g tkiva miokarda iz kojega su izolirane i umnožene matične stanice. 4 mjeseca nakon operacije intrakoronarnom infuzijom uneseno je  $1 \times 10^6$  autolognih c-kit+ CSC u srce. Navedeni odmak od 4 mjeseca omogućio je oporavak i poboljšanje funkcije srca uslijed CABG, kako se učinci CABG ne bi mjerili u samom istraživanju. Analizom transplantiranih stanica utvrđeno je da su 75-98% transplantiranih stanica bile su c-kit+, dok su 0.1-27% stanica bile usmjerene matične stanice miocita, glatkih mišićnih stanica i endotelnih stanica. Nije bilo nuspojava povezanih s terapijom u tijeku praćenja od godine dana. Istraživanje je pokazalo je značajno smanjenje veličine ožiljka, poboljšanje LVEF, te poboljšanje kvalitete života. LVEF se poboljšala s medijana od 30.3% prije CSC infuzije, na 35.9% jedan mjesec nakon infuzije matičnih stanica ( $p=0.014$ ), te na 38.5% nakon četiri mjeseca ( $p=0.001$ ). Nakon toga nije bilo značajnog poboljšanja do kraja 12 mjeseca praćenja. S druge strane, kod pacijenata iz kontrolne skupine nije bilo poboljšanja u periodu od 4 mjeseca praćenja- LVEF je bila 30.1% na početku praćenja, a 30.2% nakon 4 mjeseca. U eksperimentalnoj skupini nađena je i poboljšana pokretljivost srca, i to ne samo u injektiranom području. cMRI s gadolinijem pokazao je smanjenje veličine infarkta za 24% nakon 4 mjeseca, te za 30% nakon 12 mjeseci. Postignuto je i poboljšanje u kvaliteti života mjereno MLHFQ skorom i smanjenje NYHA skora za jedan funkcionalni razred (sa 2.19 na 1.63) nakon 4 mjeseca od terapije. Budući da ne postoji metoda praćenja sudbine CSC u srcu, ne može se sa sigurnošću utvrditi da li je navedeno poboljšanje posljedica diferencijacije unesenih matičnih stanica, induciranja postojećih matičnih stanica u srcu ili pak nekog drugog mehanizma. Nedostatci ovog istraživanja su mali broj ispitanika, te otvoreni dizajn studije bez kontrole se placebo (Bolli R i sur., 2011).

**Kardiosfere** su istraživane u kliničkom istraživanju 1 faze, završenom 2012. godine pod nazivom CADUCEUS (Cardiosphere-Derived aUtologous stem Cells to reverse ventricUlar dySfunction) (Makkar RR i sur., 2012). U ovome su randomiziranom kliničkom pokusu autori pacijentima s preboljenim IM unazad 1.5-3 mjeseca i LVEF 25-45% intrakardijalno injicirali stanice derivirane iz kardiosfera (CDC). Uspjeh terapije pratili su cMRI. Pokazali su da pacijenti za 6 mjeseci imaju za 28% manju masu ožiljka, te za 12 mjeseci 42% manju masu ožiljka (Feng Y i sur., 2012). *In vivo* efekti dobiveni transplantacijom kardiosfera bi mogli biti posljedica direktne regeneracije kardiomiocita i parakrinih efekata (Zhang H i sur., 2014).

### 7.5. Prednosti i nedostaci pojedinih vrsta matičnih stanica

U tablici 3. prikazane su prednosti i nedostaci pojedinih vrsta matičnih stanica u terapiji zatajenja srca.

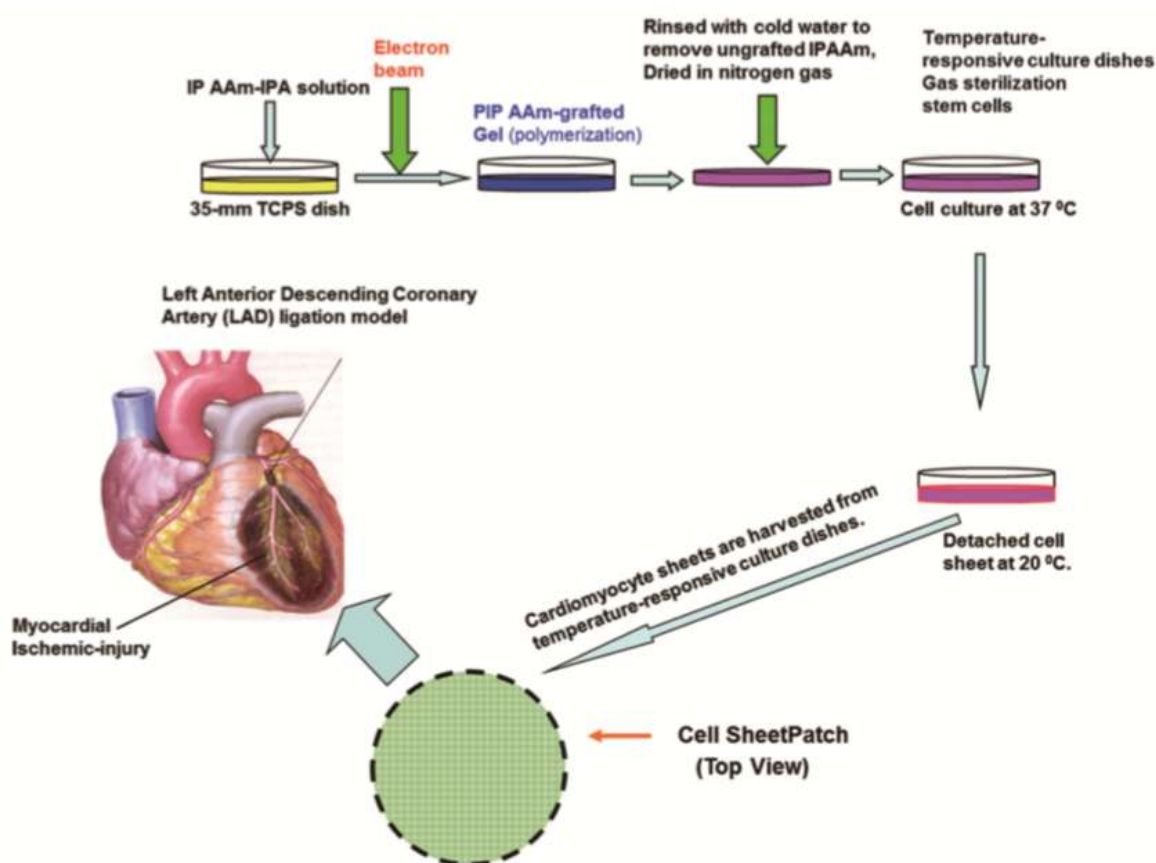
Tablica 3. Različite vrste matičnih stanica u terapiji zatajenja srca - adaptirano prema (Zhang H i sur., 2014)

	ESC	iPSC	BMSC	MSC	CSC
Izvor stanica	ograničen	neograničen	ograničen	neograničen	ograničen
Diferencijacija u kardiomiocyte <i>in vivo</i>	+	+	-	-	+
Parakrini efekti	+	+	+	+	+
Imunosna reakcija	+	+	Ukoliko su autologne ne postoji	Ukoliko su autologne ne postoji	Ukoliko su autologne ne postoji
Nastanak teratoma	+	+	-	-	-
Poboljšanje funkcije <i>in vivo</i>	+	+	+	+	+
Etičke dvojbe	da	ne	ne	ne	ne
Klinička istraživanja	-	-	Faza III	Faza III	Faza I

### 7.6. Metode primjene matičnih stanica

Putovi primjene ovih stanica su vrlo raznoliki. Raspravlja se o intravenskoj primjeni, intrakoronarnoj i intrakardijalnoj injekciji. Kod životinja su svi ti putevi primjenjivi, međutim u ljudi se matične stanice većinom primjenjuju transendokardijalno ili intrakoronarno tijekom PCI, ili se u tijeku CABG operacije na otvorenome srcu injektiraju direktno intrakardijalno ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Međutim, prilikom injekcije stanica u miokard dio stanica bude otplavljen u druga tkiva ili stanice izgube funkciju uslijed mehaničkog stresa (Sawa Y i Miyagawa S, 2013). Osim navedenih injekcija suspenzija stanica, koje rezultiraju slabim zadržavanjem stanica, razvijaju se nove metode primjene stanica. Radi se o drugoj generaciji regenerativne terapije miokarda– kardiomioplastici tkivnim inženjeringom. Primjer za to su tkivnim inženjeringom dobivena srčana tkiva razvijena na biorazgradivim matricama. Njima je, u usporedbi sa suspenzijom stanica, postignuto bolje zadržavanje stanica u ciljnom tkivu. Međutim, uočeno je samo marginalno funkcijsko poboljšanje. Moguće je da razgradnja matrice uzrokuje upalne i fibrozne promjene (Li RK i sur., 1999). Nedavno je razvijena i

metoda inženjeringa staničnog lista načinjenog od progenitornih stanica (slika 8). Ove se stanice uzgajaju u posudu za staničnu kulturu prekrivenim polimerom osjetljivim na temperaturu PIPAAm (N-isopropilakrilamid). Na 37°C on je hidrofoban i stanice na njega adheriraju i dijele se, dok na 20°C postaje hidrofilan, bubri i odvaja se od podloge. Pri tome nema oštećenja stanične površine, izvanstaničnog matriksa i narušavanja interakcija među stanicama uzrokovanog enzimskom razgradnjom ili upotrebom etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Masuda S i sur., 2008) (Sawa Y i Miyagawa S, 2013).



Slika 8. Procedura kardiomioplastike tkivnim inženjeringom (Feng Y i sur., 2012)

Ovom je tehnologijom moguće napraviti 3D srčano tkivo slažući slojeve stanica jedan na drugi. Ti su se slojevi brzo funkcionalno i strukturno povezali, što je pokazano ekspresijom koneksina 43 i stvaranjem spontanog srčanog ritma (Shimizu T i sur., 2002). Nakon implantacije ovi su se stanični listovi graftovi uspješno spojili sa srcem štakora s ishemičnom srčanom bolesti, smanjili su formiranje ožiljka i poboljšali srčanu funkciju te time poboljšali sigurnost i efikasnost procedure (Miyagawa S i sur., 2005). Do sada su razvijeni stanični listovi sačinjeni od brojnih vrsta progenitornih stanica, primjerice: skeletnih mioblasta (Memon IA i sur., 2005), MSC (Zhang D i sur., 2010), srčanih progenitornih stanica

(Zakharova L i sur., 2010) i kardiomiocita deriviranih iz iPSC (Miki K i sur., 2012). Kliničke studije u kojima su stanični listovi transplantirani epikardijalno pokazale su poboljšanje dijasoličke funkcije srca (Saito S i sur., 2012). Najveći problem ostaje nedostatna krvna opskrba, te to što transplantacija većeg broja staničnih listova rezultira slabijim rezultatima (Sawa Y i Miyagawa S, 2013).

### **7.7. Transplantacija diferenciranih i nediferenciranih stanica**

Usporedimo li transplantaciju pluripotentnih stanica i transplantaciju *in vitro* diferenciranih matičnih stanica, pokazalo se da je transplantacija *in vitro* diferenciranih matičnih stanica kod životinja bila uspješnija i sigurnija. Kod transplantacije nediferenciranih ESC (embrioidnih tijela) u ishemični miokard preživljenje stanica bilo je slabo, a male nakupine preživjelih stanica često su sadržavale i druga ne-srčana tkiva poput malih cista obloženih epitelom (Laflamme MA i sur., 2007). Transplantacija nediferenciranih stanica u imunosuprimiranog primaoca u velikom broju slučajeva rezultira formacijom teratoma. Stoga se novija istraživanja usredotočuju na stanice koje su diferenciranije- progenitorne stanice ili kardiomiocyte.

## 8. Diskusija

### 8.1. Trenutna uloga matičnih stanica u terapiji IM-a i CHF-a

Morbiditet i mortalitet od kardiovaskularnih bolesti u svijetu raste. Veliki se napori ulažu u prevenciju tih bolesti promjenom životnih navika, ali unatoč tome znatan broj ljudi doživi infarkt miokarda. Velik broj pacijenata koji prežive akutnu fazu razvija kroničnu ishemijsku bolest srca. Nju često prati slaba ejekcijska frakcija i brojna funkcionalna ograničenja u životu bolesnika. Unatoč postavljanju stentova ili revaskularizacijskoj terapiji, medikamentoznoj terapiji u akutnoj i kasnije kroničnoj fazi bolesti, te različitim uređajima kojima se potpomaže slaba funkcija lijevog srca, liječenje terminalne faze ishemijske kardiomiopatije je neuspješno. Zbog toga se mnogo nade polaže u terapiju matičnim stanicama i već se gotovo 20 godina intenzivno radi na pronalasku stanica koje bi obnovile miokard, smanjile ožiljno tkivo i poboljšale oštećenu srčanu funkciju. S jedne strane traže se načini na koje bi se moglo potaknuti matične stanice u samome srcu na aktivaciju, migraciju iz svojih niša do mjesta ozljede, proliferaciju i diferencijaciju u funkcionalne kardiomiocyte. S druge strane, nastoji se naći ekstrakardijalne matične stanice koje bi se udomile u infarciranom srcu i same se diferencirale u kardiomiocyte ili pak svojim parakrinim djelovanjem stimulirale preživljenje i funkciju kardiomiocita ili srčanih matičnih stanica. Za sada u kliničkoj primjeni terapija matičnim stanicama u IM-u i CHF-u je pokazuje mala funkcijska poboljšanja, primjerice porast LVEF za 5%, premda su neke studije imale i bolje rezultate. Međutim, terapija matičnim stanicama ne djeluje istim mehanizmima kao klasična medikamentozna ili invazivna terapija srčanih bolesti, te ima potencijala postati dodatno terapijsko sredstvo uz standardnu terapiju. Stoga je teško očekivati da će ova strategija u potpunosti zamijeniti dosadašnju terapiju, već je vjerojatnije da će pružiti još jednu terapeutsku opciju u ljudi s terminalnim zatajenjem srca.

Ovisno o tome koliko vremena imamo na raspolaganju za pripremu stanične terapije, matične stanice možemo primijeniti u dva oblika. U kratkom roku mogu se prikupiti stanice iz koštane srži, selektirati željene stanice prema površinskim markerima, te ih odmah presaditi u srce bolesnika. Ova bi terapija bila moguća u terapiji akutnog infarkta miokarda. Za uzgoj i umnožavanje stanica u kulturi, te njihovu diferencijaciju potrebno je vrijeme. Takva bi terapija injiciranjem suspenzije diferenciranih i umnoženih staničnih preparata dobivenih iz vlastitih matičnih stanica ili stvaranjem listova tkiva od vlastitih matičnih stanica bila moguća jedino u terapiji kronične srčane bolesti. Ta metoda također bi bila skuplja, zbog više rada i



materijala koji mora biti uložen u ovakvu proceduru. Alogenična transplantacija već pripremljenim diferenciranim ili nediferenciranim stanicama bila bi mnogo brža, i time pogodna i za hitne slučajeve. Međutim, da bi se mogla primijeniti potrebna je imunosupresija, vjerojatno doživotno, što nosi znatne rizike. Kako bi se zaobišla imunosna reakcija, istraživana je i produkcija heterolognih genetski modificiranih stanica koje ne bi izražavale HLA antigene. Ove stanice nisu se pokazale kao dobra alternativa jer su aktivirale NK stanice, koje su ih uklonile.

## **8.2. Mehanizmi djelovanja matičnih i progenitornih stanica**

Iz brojnih provedenih istraživanja mogu se razlučiti tri glavna mehanizma kojima matične stanice doprinose funkciji ishemijom oštećenog srca, barem u životinjskim modelima. To su diferencijacija u kardiomiocite, imunomodulatorni učinci i parakrini efekti. Imunomodulatorni učinci očituju se smanjenom infiltracijom tkiva leukocitima, te smanjenim oštećivanjem i smrću okolnih kardiomiocita. Diferencijaciju u kardiomiocite pokazuju samo neke matične stanice, primjerice ESC, iPSC i CSC. Diferencirane stanice uz karakteristične morfološke osobine, pokazuju i sposobnost povezivanja s drugim kardiomiocitima domaćina, stvaranje funkcionalnog, elektromehaničkog sincicija. Ultrazvučno zadebljanje srca u sistoli miševa kojima su transplantirani kardiomiociti govori u prilog postojanju više jedinica koje generiraju silu u srčanoj stijenci s infarktom i funkcionalnoj integraciji transplantiranih kardiomiocita. Također se mogu primijetiti i promjene u EKG-u, kao moguća posljedica te integracije. Unatoč tome, teško je točno odrediti da li se graftovi sinkrono kontrahiraju s ostatkom srca čak i pomoću MRI. Sa sigurnošću bi se to moglo provjeriti samo intravitalnim oslikavanjem kalcijem. Parakrini efekti također bi mogli poboljšati kontraktilnu funkciju srca potičući angiogenezu, poboljšavajući strukturu izvanstaničnog matriksa, smanjujući fibrozu ili modulirajući upalni odgovor na oštećenje tkiva, te održavanjem oštećenih kardiomiocita na životu. Sve transplantirane stanice djeluju parakrinim mehanizmima. Oni su važan mehanizam djelovanja MSC, koje nemaju sposobnost diferencijacije u kardiomiocite.

## **8.3. Uspjesi istraživanja na životinjama i klinička istraživanja**

Preklinička istraživanja transplantacije matičnih stanica pokazala su pozitivne efekte na srčanu funkciju i sigurnost. Međutim, u ljudi tako izraženi pozitivni efekti nisu reproducirani. Jedna je mogućnost da u čovjeka postoje drugi mehanizmi diferencijacije, opstanka i djelovanja matičnih stanica, koji onemogućuju prihvatanje, organizaciju i funkcionalnu integraciju matičnih stanica kod čovjeka. Te bi razlike mogle potjecati s mnogo razina- od

regulacije genske ekspresije, djelovanja enzima, odnosno postojanja različitih vrsta enzima, interakcije među stanicama, građe izvanstaničnog matriksa, reakcije stanica na ozljedu, osobitosti imunskog ili upalnog odgovora. Nedostatak brojnih provedenih studija je da se stanice injektiraju u krvne žile srca. Pri tome se ne zna gdje te stanice završavaju- u srcu ili u drugim tkivima. Pitanja su mogu li iz krvne žile prijeći u željeno tkivo- posjeduju li odgovarajuće receptore za prihvaćanje na endotel krvne žile i prolazak kroz nju, kako će u tkivu opstati- budući da se radi o ishemičnom području, zahvaćenom raspadom stanica i upalom ili u kroničnoj fazi ožiljno promijenjenom području. Većinom se radi o stanicama koje su u velikom stresu zbog odvajanja od okoline u kojoj su se do tada nesmetano razvijale (bila to koštana srž kod direktnog injektiranja ili petrijeva posuda kod uzgoja stanica). Postoji mogućnost da bi se djelomičnom razgradnjom ožiljnoga tkiva moglo poboljšati ugnježđenje matičnih stanica i njihov opstanak, međutim to nosi rizike od prejake razgradnje stijenke srca i rupture ili pak stvaranja aneurizme. S druge strane, izradom mješavine sačinjene od više vrsta matičnih stanica među kojima bi bile i stanice koje bi izgradile kapilare ili dodavanjem faktora rasta koji bi to poticali moglo bi se produljiti preživljenje stanicama u neprijateljskom okruženju ožiljka i poboljšati dostava kisika te smanjiti stres. Drugi faktor koji bi mogao doprinjeti boljem preživljavanju je prekondicioniranje organizma ili pak samih stanica prije transplantacije. U životinja se prekondicioniranje postiže uporabom inhalacijskih anestetika ili višekratnim kraćim okluzijama koronarnih arterija prije transplantacije matičnih stanica. Moguće je i prekondicionirati same stanice koje se transplantiraju upotrebom istih inhalacijskih anestetika, tvari koje otvaraju  $K_{ATP}$  kanale ili adenzina. Na taj se način usporava nekroza kardiomiocita, tj. transplantiranih stanica, odnosno produžuje njihovo preživljenje. Kod čovjeka bi sličan postupak mogao doprinjeti boljem prihvaćanju transplantiranih matičnih stanica. Zbog različitih metoda primjene stanica, malog broja ispitanika u istraživanjima i različitih metoda praćenja učinka terapije, teško je usporediti uspješnost pojedine metode i vrste matičnih stanica. Uz to postoji i razlika u indikaciji za pojedinu vrstu terapije, što povećava mogućnost zabune zbog indikacije. Na primjer ne možemo uspoređivati rezultate studija u kojima su pacijenti nakon koronarografije i pacijenti nakon CABG primali matične stanice određene vrste, budući da indikacije za te dvije intervencije, odnosno težina bolesti i opseg aterosklerotskog zahvaćanja koronarne cirkulacije nisu jednake u te dvije skupine pacijenata.

#### **8.4. Metode primjene**

Injekcije suspenzije matičnih stanica koje su dugi niz godina bile istraživane nisu opravdale očekivanja i sveukupno su pokazale slaba funkcionalna poboljšanja. Jedan od razloga je mali broj matičnih stanica u ukupnoj suspenziji koja se injektira, a druga je slabo zadržavanje i preživljenje stanica u ciljnom tkivu- miokardu. Transplantati sačinjeni od listova miokardijalnog tkiva dobiveni pomoću tehnologije termoosjetljive gel podloge je obećavajuća terapija za popravak oštećenog miokarda. Preživljenje stanica korištenjem listova tkiva je mnogo bolje nego u drugim tehnikama. Međutim i kod ove terapije listovima stanica postoje neka ograničenja. Na primjer, iako je prikladna za zatajenje srca, nije primjenjiva u hitnim situacijama. Trenutna se primjena ograničava na epikardijalnu transplantaciju što ograničava krvnu opskrbu takvome transplantatu i reducira njegove učinke. Terapija matičnim i progenitornim stanicama zahtjeva poboljšanje i uniformnost u kvaliteti kultiviranih stanica.

#### **8.5. Rizici**

U staničnoj terapiji srčane bolesti, akutna životno ugrožavajuća nuspojava može biti aritmogenost. Smatra se da je ona vjerojatnija ako se transplantirane stanice međustaničnim vezama spoje s ostalim kardiomiocitima i sudjeluju u stvaranju i provođenju impulsa u srcu. Ukoliko bi njihov ritam bio brži od spontane depolarizacije i repolarizacije srčanog predvodnika mogu nastati tahiaritmije. Isto tako ako nastane neki povratni snopić, također su moguće kružne aritmije. Druga je opasnost stvaranje tumora, primjerice kod transplantacije pluripotentnih matičnih stanica poput ESC ili iPSC na životinjama su se javljali teratomi. Imunogenost i moguća senzibilizacija na vlastite antigene također su pronađene primjerice kod upotrebe iPS stanica zbog genetskih grešaka koje se nagomilaju njihovim reprogramiranjem.

#### **8.6. Budući izazovi**

Sveukupno, matične stane mnogo obećavaju u budućoj terapiji, ali ostaju značajne tehničke poteškoće, koje mogu biti prevladane uz godine intenzivnog istraživanja. Potrebno je osigurati dostatnu proliferaciju *in vitro* stanica kako bi se dobila značajna, terapijska količina. Te stanice moraju biti sigurne za primaoca. To znači da moraju biti dobro diferencirane kako bi se izbjegle pojedine stanice koje bi onda formirale teratome. Također je važno izbjeći genetske pogreške generirane u nakupini stanica, budući da bi takve pogreške mogle generirati tumore ili pak biti okidač autoimunoj reakciji. Na temelju brojnih studija rezultati su za sada relativno skromni, s malim povećanjem EF te malim smanjenjem mase infarkta.

Unatoč tome neke su vrste stanica došle do 2. i 3. faze kliničkih istraživanja, uglavnom se tu radi o MSC. Terapijski učinci tih stanica mogu se pripisati faktorima koje te stanice izlučuju. Oni bi se da su ekonomski pristupačniji mogli jednostavnije i sigurnije primijeniti sami, bez stanica, pri čemu opet ostaje pitanje učinkovite dostave. Još je potrebno definirati optimalnu dozu pojedinih vrsta transplantiranih stanica i način primjene. Uz to matične se stanice mogu zamrznuti, što bi potencijalno omogućilo bolje učinke višestrukim ponovljenim dozama autolognih matičnih stanica.

## 9. Zaključak

Terapija matičnim stanicama kao tretman infarciranog miokarda je obećavajuća, naročito u pretkliničkim studijama. Nakon transplantacije, matične stanice u životinjskim modelima pokazuju parakrine učinke, diferencijaciju u kardiomiocyte, te imunomodulatorne efekte koji doprinose poboljšanju funkcije miokarda. Meta analize kliničkih studija pokazuju skromnije rezultate. Usporedba rezultata vrlo je neprecizna zbog brojnih vrsta stanica uključenih u klinička istraživanja, različite razine pročišćenosti primijenjenih preparata, razlike u metodama primjene i indikacijama u kojima su primjenjivane. Uzmemo li LVEF kao pokazatelj učinkovitosti terapije, većina metaanaliza pokazuje oko 5% poboljšanje nakon godinu dana uz primjenu terapije matičnim stanicama: u usporedbi s kontrolom terapija s MSC povisuje LVEF za 2.99%, transplantacijom HSC dolazi do poboljšanja LVEF za 5.4%, transplantacijom c-kit+ CSC LVEF raste sa 30.3% prije terapije, na 38.5% četiri mjeseca nakon infuzije matičnih stanica. Gotovo sve kliničke studije pokazuju sigurnost, ali što se tiče efikasnosti ostaje mnogo prostora za napredak. Mnoge su nepoznanice u terapiji ljudskog miokarda matičnim stanicama: koja je optimalne vrsta stanice za transplantaciju, u kojoj dozi, da li je potrebno njihovo obogaćivanje, pitanje diferencijacije i u kojem stadiju je najuspješnija transplantacija, koja je optimalna metoda primjene, kako optimizirati parakrine učinke te stvaranje novih krvnih žila. Postavlja se pitanje kolika je važnost prekondicioniranja ili zaštite od ishemije prije i za vrijeme implantacije. Terapija matičnim stanicama sve se češće spominje kao dodatna metoda liječenja infarciranog miokarda, a broj znanstvenih istraživanja na ovome području eksponencijalno raste, pružajući nadu da će jednoga dana biti moguće srce liječiti tako da se uspjehom neće smatrati zaustavljanje procesa gubitka funkcije, već aktivno poboljšanje srčane funkcije pomoću novih, funkcionalno integriranih kardiomiocita.

## **10. Zahvale**

Puno hvala mentoru doc. dr. dc. Filipu Sedliću na strpljenju, pristupačnosti i odličnim i konstruktivnim prijedlozima koji su omogućili nastanak ovoga rada. Jednako tako zahvaljujem članovima komisije prof. dr. sc. Maji Sirotković Skerlev i prof. dr. sc. Jasenki Markeljević na vremenu uloženom u čitanje i ocjenjivanje rada.

Zahvaljujem se i osoblju bolnice u Kleveu koje me zainteresiralo za područje kardiologije, te prof. Zdenku Kovaču koji je neumornim radom sa svojim demonstratorima proširio moje vidike o brojnim područjima patofiziologije i zainteresirao me za ovu tematiku.

Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji na potpori i razumijevanju, te svim poticajima koje su mi pružili u životu i školovanju.

## 11. Literatura

1. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA (2007) *Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis* Arch Intern Med; 167:989-97.
2. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A (2007) *Human cardiac stem cells* Proc Natl Acad Sci USA; 104: 14068-14073.
3. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E (2003) *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration* Cell; 114:763-776.
4. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner GS, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P (2011) *Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial* Lancet; 738:1847-57.
5. Buljević B, Reiner Ž (2010) Lijekovi sa učinkom na kardiovaskularni sustav U: Francetić i sur.(Ur.) *Farmakoterapijski priručnik* Zagreb, Medicinska naklada, str. 182-250.
6. Caspi O, Gepstein L (2006) *Regenerating the Heart Using Human Embryonic stem Cells-from Cell to Bedside* IMAJ; 8:208-214.
7. Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, Yankelson L, Arondson D, Beyar R, Gepstein L (2007) *Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Improves Myocardial Performance in Infarcted Rat Hearts* J Am Coll Cardiol;50:1884-93.
8. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP (2004) *Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction* Am J Cardiol; 94:92-95.
9. de Almeida PE, Ranshoff PE, Nahid A, Wu JC (2013) *Immunogenicity of Pluripotent Stem Cells and Their Derivates* Circ Res;112:549-561.
10. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ (2011) *Mesenchymal Stem Cells* Cell Transplantation; 20:5-14.
11. Feng Y, Wang Y, Chao N, Yang H, Wang Y (2012) *Progenitor/ stem cell transplantation for repair of myocardial infarction: Hype or hope?* Ann Paliat Med; 1:65-77.

12. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W (2009) *A randomised, double-blind, placebo controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction* J am Coll Cardiol;54:2277-86.
13. He JQ, Vu DM, Hunt G, He JQ, Vu DM, Hunt G, Chugh A, Bhatnagar A, Bolli R (2011) *Human cardiac stem cells isolated from atrial appendages stably express c-kit* PLoS ONE; DOI: 10.1371/journal.pone.0027719.
14. Hopp E, Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Forfang K, Edvardsen T, Smith HJ (2011) *Regional myocardial function after intracoronary bone marrow cell injection in reperfused anterior wall infarction – a cardiovascular magnetic resonance tagging study* Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance 13:22.
15. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehs215>
16. <http://emedicine.medscape.com/article/155919-overview>
17. <http://emedicine.medscape.com/article/155919-treatment#aw2aab6b6b8>
18. <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>
19. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=progenitor%20cells>
20. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/data-and-statistics>
21. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=myocardial+infarction+and+stem+cell+transplantation&pg=1>
22. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=myocardial+infarction+and+stem+cell+transplantation&pg=2>
23. Jesty SA, Steffey MA, Lee FK, Breitbach M, Hesse M, Reining S, Lee JC, Doran RM, Nikitin AY, Fleischmann BK, Kotlikoff MI (2012) *C-kit<sup>+</sup> precursors support postinfarctio myogenesis in neonatal, but not adult heart* Proc Natl Acad Sci USA;109:13380-13385.
24. Kawaguchi N, Smith AJ, Waring CD, Hasan MK, Miyamoto S, Matsuoka R, Ellison MG (2010) *C-kit<sup>+</sup> GATA4 high rat stem cells foster adult cardiomyocyte survival through IGF-1 paracrine signalling* PLoS ONE; DOI: 10.1371/journal.pone.0014297
25. Kehat I, Khimovich L, Caspi O (2004) *Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells* Nat Biotechnol; 22:1282-9.



26. Kovač Z, Gamulin S (2011) Integralna reakcija stanice na ozljedu U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. (Ur.) *Patofiziologija* Zagreb, Medicinska naklada, str. 137-142.
27. Krušlin B i Nola M (2011) *Bolesti srca* U: Damjanov I, Jukić S, Nola M. (Ur.) *Patologija* Zagreb, Medicinska naklada str. 329-384.
28. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE (2007) *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts* Nature Biotechnology; 25:1015-1024.
29. Leri A, Kajstura J, Anversa P (2011) *Role of Cardiac Stem Cells in Cardiac Pathophysiology: A Paradigm shift in Human Myocardial Biology* Circ. Res; 109: 941-961.
30. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM (1999) *Survival and function of bioengineered cardiac grafts* Circulation;100:II-63-II-69.
31. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E (2012) *Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised, phase 1 trial* Lancet; 379:895-904.
32. Masuda S, Shimitzu T, Yamato M, Okano T (2008) *Cell sheet engineering for heart tissue repair* Adv Drug Deliv Rev; 60:277-85.
33. Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Taketani S, Sakakida SK, Kondoh H, Aleshin AN, Shimizu T, Okano T, Matsuda H (2005) *Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets* J Thorac Cardiovasc Surg;130:1333–1341.
34. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA (2008) *The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation* Circulation;117:1189–1200.
35. Miki K, Uenaka H, Saito A, Miyagawa S, Sakaguchi T, Higuchi T, Shimizu T, Okano T, Yamanaka S, Sawa Y (2012) *Bioengineered myocardium derived from induced pluripotent stem cells improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling*

- following chronic myocardial infarction in rats* Stem Cells Translational Medicine;1:430–437.
36. Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, Taketani S, Kondoh H, Memon IA, Imanishi Y, Shimizu T, Okano T, Matsuda H (2005) *Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium:their integration with recipient myocardium* Transplantation;80:1586-95.
  37. Murphy E, Steenbergen C (2008) *Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury* Physiol Rev 88: 581–609
  38. Murray L, Wilkinson IB, Davidson E (2010) *Oxford Handbook of clinical medicine* Oxford, Oxford University Press
  39. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium* Nature; 410:701-705.
  40. Saito S, Miyagawa S, Sakaguchi T, Imanishi Y, Iseoka H, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Sawa Y (2012) *Myoblast sheet can prevent the impairment of cardiac diastolic function and late remodeling after left ventricular restoration in ischemic cardiomyopathy* Transplantation;93:1180–1115.
  41. Sawa Y, Miyagawa S (2013) *Present and Future Perspectives on Cell Sheet-Based Myocardial Regeneration Therapy* Biomed Res Int. 2013: 583912.
  42. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hoelschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Sueselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) *Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial* Eur Heart J; 27:2775-83.
  43. Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, Shibata T, Isoi Y, Kikuchi A, Umezu M, Okano T (2002) *Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets.* Journal of Biomed Mater Res; 60:110–117.
  44. Sylvester KG, Longaker MT (2004) *Stem Cells* Arch Surg;139: 93-99.
  45. Šmalcelj A i Duraković Z (2011) *Poremećaji koronarnog krvotoka U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. (Ur.) Patofiziologija Zagreb, Medicinska naklada, str. 891-901.*

46. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors* Cell;131:861-72.
47. Takahashi K, Yamanaka S (2006) *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors* Cell;126: 663-676.
48. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI (2005) *Paracrine Action Enhances the Effects of Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Vascular Regeneration in Rat Model of Myocardial Infarction* Ann Thorac Surg; 80:229-37.
49. Tomai F, Crea F, Chiarello L (1999) *Ischemic Preconditioning in Humans: Models, Mediators, and Clinical Relevance* Circulation; 100: 559-563.
50. Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B i sur. (2003) *Interna medicina* Zagreb, Naklada Ljevak
51. Watt FM, Hogan BL (2000) *Out of Eden: Stem Cells and Their Niches* Science; 287: 1427-1430.
52. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004) *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial* Lancet; 364:141-8.
53. Yamanaka S (2009) *A Fresh Look at iPS Cells* Cell; 137:13-17.
54. Yoo SW, Chang DY, Lee HS, Kim GH, Park JS, Ryu BY, Joe EH, Lee YD, Kim SS, Kim HS (2013) *Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in ischaemic brain is mediated by TBF- $\beta$*  Neurobiology of Disease; 58: 249-257.
55. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells* Science;318:1917-20.
56. Yu T, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura M, Kawamura T, Ito E, Kawaguchi N, Sawa Y, Matsuura N (2013) *In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes* Circ J; 77:1297-306.
57. Zakharova L, Mastroeni D, Mutlu N, Molina M, Goldman S, Diethrich E, Gaballa MA (2010) *Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function* Cardiovasc Res;87:40-9.
58. Zhang D, Huang W, Dai B, Zhao T, Ashraf A, Millard RW, Ashraf M, Wang Y (2010) *Genetically manipulated progenitor cell sheet with diprotin A improves myocardial function and repair of infarcted hearts* Am J Physiol Heart Circ Physiol;299:H1339-47.

59. Zhang H, Wang H, Li N, Duan CE, Yang YJ (2014) *Cardiac progenitor/stem cells on myocardial infarction or ischaemic heart disease: what we have known from current research* Heart Fail Rev; 19: 247-258.

## 12. Životopis

Imam 24 godine i rođena sam u Zagrebu. Pohađala sam OŠ Vrbani, a potom sam završila prirodoslovno-matematičku V. gimnaziju u Zagrebu, također s odličnim uspjehom. Više sam puta sudjelovala na županijskim i državnim natjecanjima i smotrama istraživačkih radova iz biologije, fizike i informatike, te na smotrama istraživačkih radova poput VipEureke. Pohađala sam ljetnu školu znanosti S3++ u Višnjanu, te Ljetnu školu mladih biologa. 2009. godine upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu. Na 3. godini osvojila sam Dekanovu nagradu. Urednica sam rubrike znanost u studentskom časopisu „Medicinar“. Demonstrator sam iz predmeta patofiziologija. U tijeku studija napravila sam dva znanstvena istraživanja „EKG promjene prilikom kateterske ablacije sporog puta AVNRT“ prezentirane za ZIMS-u 2014. te sam osvojila 1. mjesto u konkurenciji poster prezentacija, te „Komorbiditet onkološkog bolesnika u ordinaciji obiteljske medicine“ objavljenog na kongresu DNOOM 2015. gdje sam osvojila 3. mjesto na poster prezentaciji. Zanima me kardiologija, te sam nakon završene 4. godine mjesec dana provela na Odjelu Kardiologije u Kleveu, u Njemačkoj, na razmjeni koju je organizirao fakultet. Tečno govorim engleski i njemački, a služim se i francuskim. Pohađala sam nekoliko tečaja škola stranih jezika Beču, Berlinu i Pettreboroughu. Bila sam stipendist Grada Zagreba za učenike, te sada primam stipendiju Grada Zagreba za nadarene studente. Treniram tenis, te sam na Humanijadi u Sarajevu 2013. osvojila 3. mjesto za MEF Zagreb. Također treniram TaeKwonDoe u studentskoj udruzi SUBOS. Volim putovati, bavim se skijanjem, jedrenjem na dasci, ronjenjem s bocom.